

GIOVANI PISA

**CONSTRUÇÃO DE INICIADORES E AMPLIFICAÇÃO DO 23s
rDNA PARA ANÁLISE DA DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS DE ABACAXIZEIRO (*Ananas
comosus*) E BANANEIRA (*Musa* spp.)**

**Monografia apresentada à disciplina
Estágio em Bioquímica, BQ016,
Coordenação de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do
Bacharelado em Ciências Biológicas.**

**Orientador: Profº Leonardo Magalhães
Cruz**

**CURITIBA
2004**

RESUMO

No presente trabalho foram construídos oligonucleotídeos iniciadores visando à amplificação e seqüenciamento do 23S rDNA de Proteobactérias para auxiliar na análise da diversidade através de técnicas moleculares. Foram conduzidos diversos testes para estabelecer as condições de PCR para amplificação do gene em bactérias diazotrófica endofíticas isoladas de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) e bananeira (*Musa* spp.). Experimentos de digestão de DNA cromossomal com enzimas de restrição dos isolados também foram realizados para análise genômica.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	6
1.1	Fixação Biológica de Nitrogênio	6
1.2	Organismos diazotróficos endofíticos associativos e sua diversidade	7
1.3	Técnicas para análise da diversidade e tipagem microbiana	9
1.4	RNA ribossomais	11
2	Objetivos.....	14
2.1	Objetivos específicos	14
3	Material e Métodos	15
3.1	Estirpes usadas	15
3.2	Cultivo das estirpes	17
3.3	Extração de DNA cromossômico	19
3.4	Restrição do DNA cromossomal por endonucleases de restrição e eletroforese.....	20
3.5	Desenho dos iniciadores para 23S rDNA	20
3.6	Amplificação do 23S rDNA.....	21
4	Resultados.....	22
4.1	Análise dos perfis de restrição	22
4.2	Construção dos iniciadores para amplificação e seqüenciamento do 23S rDNA	24
4.3	Amplificação do 23S rDNA de bactérias diazotróficas endofíticas.....	30
4.3.1	Variação na concentração de <i>Taq</i> DNA polimerase e DNA molde	34
4.3.2	Curva de temperatura.....	37
5	Discussão	38
5.1	Restrição de DNA cromossomal	38
5.2	Amplificação do 23S rDNA.....	38
6	Conclusões.....	41
7	Referências Bibliográficas.....	42
8	Apêndice.....	45
8.1	Operon RRNA de <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	45
8.2	Alinhamento para os consensos do 23S rRNA das subdivisões das Proteobactérias. ...	48

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE ABACAXIZEIRO (<i>ANANAS COMOSUS</i>) E BANANEIRA (<i>MUSA SPP.</i>) CULTIVADOS NOS ESTADOS DA BAHIA (BA) E RIO DE JANEIRO (RJ) E OUTRAS ESTIRPES UTILIZADAS	16
TABELA 2. PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQÜENCIAMENTO DO 23S RDNA.	27
TABELA 3: COMBINAÇÕES DE INICIADORES PARA AS REAÇÕES DE PCR.....	31
FIGURA 4: AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE 23S RDNA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS COM O PAR DE INICIADORES 23S130F/P23.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2. ORGANIZAÇÃO DO OPERON DE RNA RIBOSSOMAL DE H. SEROPEDICAE.....	28
FIGURA 3. AMPLIFICAÇÃO DO 23S RDNA DE ISOLADOS DE ABACAXIZEIRO E BANANEIRA E ESTIRPES Y1 E Y2 DE <i>AZORHIZOBIUM AMAZONENSE</i>	29
FIGURA 5: AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE 23S RDNA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

1.1 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O ar atmosférico é rico no elemento químico nitrogênio, na forma de um gás inerte, formado por dois átomos de nitrogênio ligados por uma tripla ligação química, muito estável (N_2). Nesta forma o nitrogênio não pode ser captado e utilizado pela maioria dos seres vivos, que necessitam deste elemento para a formação de proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos orgânicos nitrogenados. Por isso, os organismos diazotróficos desempenham um importante papel ecológico, fundamental para a manutenção do equilíbrio de qualquer ecossistema. Através de uma enzima, denominada nitrogenase, estes organismos são capazes de reduzir a tripla ligação química estável do gás nitrogênio a amônia (NH_3), um composto que pode ser assimilado e utilizado pelos organismos vivos, em um processo denominado FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO. Dada a importância do nitrogênio na composição química de elementos reguladores e estruturais, fundamentais à manutenção da vida e a escassez de formas prontamente absorvíveis pelas plantas, a Fixação Biológica de Nitrogênio é um processo de fundamental importância para a sustentabilidade da biosfera. A fixação biológica de nitrogênio é realizada exclusivamente por organismos procarióticos, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio. Grande parte da Fixação Biológica de Nitrogênio é feita por bactérias diazotróficas simbióticas, o que permite a pronta disponibilização do nitrogênio para as plantas hospedeiras. Outra importante contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio para a agricultura e o ambiente está na associação de bactérias diazotróficas endofíticas com gramíneas, além da relação simbiótica de diazotróficos com leguminosas. Alguns trabalhos de pesquisa indicam que bactérias endofíticas podem contribuir para um significativo aumento de produção em algumas culturas

agrícolas, tais como milho, trigo, arroz e cana-de-açúcar (JAMES, 2000; APP et al., 1980; BALDANI et al., 1999; URQUIAGA et al., 1992). Algumas definições foram propostas para bactérias endofíticas (DÖBEREINER, 1992; KLOPPER & BEAUCHAMP, 1992; HALLMANN et al., 1997), e apesar de pequenas diferenças apresentadas entre elas, caracterizam endofíticos como bactérias que colonizam o interior de plantas, sem necessariamente causar-lhes algum dano.

É possível ainda que a contribuição dos diazotróficos endofíticos vá além da Fixação Biológica de Nitrogênio, sendo capazes de produzir substâncias que atuam como promotores de crescimento em plantas como, por exemplo, substâncias análogas a fitormônios (BAZZICALUPO & OKON, 1999). Apesar destes diazotróficos endofíticos estarem intimamente associados às plantas, principalmente gramíneas, não há formação de estruturas especializadas como os nódulos das leguminosas formados por bactérias genericamente conhecidas por rizóbios.

1.2 ORGANISMOS DIAZOTRÓFICOS ENDOFÍTICOS ASSOCIATIVOS E SUA DIVERSIDADE

A capacidade de fixar nitrogênio não é uma característica particular apresentada por organismos bem relacionados filogeneticamente e que formam um grupo taxonômico ou filogenético bem estruturado. Ao contrário, é possível observá-la nos mais distintos grupos taxonômicos entre os procariotos (YOUNG, 1992). Na maioria das vezes o grau de relacionamento entre organismos fixadores de nitrogênio não vai além da sua capacidade fisiológica de crescer em ambientes pobres em nitrogênio.

A descoberta de organismos diazotróficos mais eficientes no uso de fontes de carbono para a fixação de N_2 , que não possuem mecanismos necessários para a proteção da nitrogenase contra tensões atmosféricas de O_2 , só foi possível com a

elucidação dos mecanismos de funcionamento da nitrogenase e o emprego de novos métodos de isolamento (DÖBEREINER *et al.*, 1995). Como exemplo destes métodos destaca-se o meio de cultura semi-sólido, onde a baixa concentração de oxigênio não prejudica a atividade redutora de nitrogênio da enzima, permitindo o isolamento de diazotróficos microaerofílicos em meio livre de nitrogênio. Esta técnica permitiu o isolamento de novas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio, pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azoarcus*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* (KIRCHHOF *et al.*, 1997b). E este novo grupo de bactérias despertou grande interesse até hoje por dois principais motivos: estarem associados principalmente com gramíneas, especialmente aquelas largamente cultivadas nos trópicos como milho, sorgo, cana-de-açúcar, diversas forrageiras, etc. e serem, na sua maioria, organismos endofíticos, ocorrendo no interior dos tecidos das plantas hospedeiras. FERREIRA *et al.* (1995) isolaram bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* de dendezeiro (*Elaeis guineensis*) e pupunheira (*Bactris gasipaes*), palmeiras com potencial para produzir mais de 12 t.ha⁻¹ de óleo. Espécies de *Azospirillum* foram também isoladas de fruteiras, como abacaxizeiro (*Ananas comosus*), bananeira (*Musa* spp.) e outras (SUBBA RAO, 1983). Em abacaxizeiro foi isolada ainda a espécie *Gluconacetobacter diazotrophicus* (TAPIA-HERNANDEZ *et al.*, 2000). WEBER (1998) identificou também os gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, além de *Azospirillum*, em plantas de abacaxizeiro e bananeira. Outras bactérias fixadoras de nitrogênio associadas foram identificadas, mas provavelmente devido a seu baixo número, ou ocorrência restrita, não são ainda bem exploradas (BALDANI *et al.*, 1997). O interesse na associação de diazotróficos com gramíneas reforça a importância do processo de Fixação Biológica de Nitrogênio para a agricultura sustentável e de subsistência no Brasil, onde baixas quantidades de fertilizantes nitrogenados são aplicadas (DÖBEREINER, 1995).

1.3 TÉCNICAS PARA ANÁLISE DA DIVERSIDADE E TIPAGEM MICROBIANA

Métodos baseados em tipagem de DNA geralmente referem-se a técnicas que permitem subdividir espécies em tipos distintos. Classicamente, a subtipagem de espécies foi realizada por análise fenotípica tal como testes bioquímicos (biotipagem) ou sorologia (sorotipagem), padrões de susceptibilidade a antibióticos, tipagem de fago ou bacteriocina, entre outros. Uma bateria de métodos de tipagem DNA dirigida foi desenvolvida, como por exemplo técnicas moleculares usadas para tipagem que contam com a separação eletroforética de fragmentos de DNA de diferentes comprimentos (OLIVE & BEAN, 1999). Estas técnicas são universalmente aplicáveis, reproduzíveis, de simples realização e altamente discriminatórias. A genotipagem tem sido usada em detrimento da tipagem clássica, baseada em métodos fenotípicos. A primeira geração de métodos baseados em tipagem de DNA inclui análise de fragmentos de restrição de genomas inteiros. Muitos padrões complexos de DNA são gerados com o uso dessa abordagem, os quais conferem certo grau de dificuldade à comparação.

Métodos que foram elaborados subsequentemente tem reduzido o número de fragmentos de DNA comparados com métodos anteriores e aumentou a confiabilidade e poder discriminatório. O número de fragmentos de DNA pode ser reduzido selecionando-se enzimas que cortam o DNA em pontos muito raros de 6-8 bases. Esta técnica é conhecida como análise de fragmentos de restrição de baixa frequência. Os fragmentos são, contudo, muito grandes para serem separados por eletroforese em gel de agarose convencional. A técnica de análise de fragmentos de restrição de baixa frequência dependeu do desenvolvimento de técnicas de eletroforese especiais, conhecidas geralmente como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). As técnicas de análise do genoma total por padrão de bandas do DNA reconhecem sítios aleatórios no genoma que não podem ser previstos sem o sequenciamento total.

genoma (GÜRTLER & MAYALL, 2001). Alternativamente, os padrões complexos de DNA gerados depois da digestão com enzimas de restrição podem ser transferidos para uma membrana e então hibridizados com uma sonda marcada, que permite revelar os fragmentos hibridizados. Um exemplo típico de um destes desenvolvimentos é o método de ribotipagem que usa rRNA como sonda (DE SMEDT et al., 1980).

Uma vasta gama de aplicações tem sido aberta com a introdução da reação em cadeia da polimerase ou PCR em laboratórios de microbiologia, onde diferentes métodos de tipagem foi desenvolvida. Métodos de tipagem de DNA baseados em PCR atraiu muito interesse por sua aplicabilidade universal, simplicidade, e rapidez. Diferentes métodos nos quais seqüências arbitrárias curtas usadas como oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) em ensaios de PCR foram descritos: oligonucleotídeos de aproximadamente 20 pares de bases foram usados em PCR com *primers* aleatórios; oligonucleotídeos de aproximadamente 10 pb são usados em análise de DNA polimórfico aleatoriamente amplificados e oligonucleotídeos de aproximadamente 5 pb são usados em *fingerprint* de DNA amplificado. Alternativamente, motivos consenso complementares a fragmentos de elementos repetitivos dispersos pelo genoma de bactérias gram-positivas ou gram-negativas ou fragmentos específicos de gene sintetizados em laboratório podem ser usados como iniciadores. Ensaios de PCR também tem sido usados para amplificar genes rDNA por meio de *primers* universais de rDNA. Os polimorfismos entre os diferentes operons de rDNA geram simples arranjos de fragmentos de DNA com diferentes comprimentos.

Tipagem baseada em PCR foi combinada com análise de enzimas no assim chamado método de análise de restrição de rDNA amplificado. O produto de PCR, sendo rDNA 16S ou 23S ou partes de ambos os genes com ou sem região intergênica, é amplificado usando-se *primers* universais localizados nas regiões conservadas dos genes de rDNA. O amplicom é subsequente digido por uma combinação de

enzimas de restrição. Em contraste a muitos outros métodos baseados em DNA, análise de restrição de rDNA amplificado gera padrões espécie específicos, que não é inesperado, considerando a característica conservada dos genes de rDNA.

Outra combinação de PCR e enzima de restrição produziu o AFLP (*amplified fragment length polymorphism*). O princípio básico do AFLP é a análise dos polimorfismos dos fragmentos de restrição mas com uma amplificação mediada por PCR para selecionar um sub-conjunto de fragmentos de DNA do conjunto de fragmentos de restrição. A restrição é realizada usando-se duas enzimas de restrição, que produz fragmentos de DNA com duas terminações diferentes, combinadas aleatoriamente. Para estas terminações, oligonucleotídeos curtos (adaptadores) são ligados para formar padrões para o PCR. A reação de amplificação seletiva é feita usando-se dois *primers* contendo a mesma sequência dos adaptadores, mas estendidas para incluir uma ou mais bases seletivas próximas ao sítio de restrição do *primer*. Apenas fragmentos que são complementares às sequências dos *primers* são amplificados. O processo de amplificação resulta num arranjo de aproximadamente 30 a 40 fragmentos de DNA, alguns dos quais são grupo-específicos, enquanto outros são estirpe-específicos. A técnica pode, contudo, ser utilizada simultaneamente para fins de identificação e propósitos de tipagem.

1.4 RNA RIBOSSOMAIS

Na década de 1970, Carl Woese e colaboradores identificaram o gene para o RNA ribossomal de 16S (16S rRNA) como um poderoso marcador filogenético (FOX *et al.*, 1980). Desde o início dos trabalhos de Woese e seus colaboradores com catálogos de oligonucleotídeos até os dias atuais, as informações sobre esta molécula, principalmente sua sequência, têm se acumulado muito. Isso se deveu, em parte, ao desenvolvimento de métodos rápidos e simples para o sequenciamento do rRNA

usando transcriptase reversa (LANE *et al.*, 1985) e mais tarde o uso da PCR (SAIKI *et al.*, 1988) para amplificação e seqüenciamento seletivo dos genes que codificam para os rRNAs, principalmente o de 16S (MEDLIN *et al.*, 1988; BÖTTGER, 1989; EMBLEY, 1991). Em consequência, mesmo aqueles marcadores que teoricamente contém mais informação filogenética como, por exemplo, a molécula de 23S rRNA, com características básicas semelhantes a do 16S rRNA, mas com aproximadamente o dobro do seu tamanho, ainda levarão um certo tempo para atingirem um volume de informação que permita usá-los em preferência ao 16S rRNA. Por outro lado, mesmo em concordância com a posição taxonômica dos organismos, genes com o 16S rDNA podem não possuir a resolução necessária para se caracterizar organismos a nível intraespecífico.

O conteúdo informativo das moléculas marcadoras é crítico na análise filogenética e o esforço para reconstruir a história de um gene ou organismo analisando seqüências moleculares particulares está em função do número e caráter das mudanças detectáveis na seqüência. Entretanto, em geral, tais marcadores são razoavelmente conservados e somente alguns sítios são variáveis e, portanto, informativos. E, mesmo nestes sítios, o número de estados de caracteres permitidos é reduzido devido a barreiras funcionais e pressão seletiva. Em teoria, a molécula do 23S rRNA, um dos marcadores filogenéticos que contém mais informação filogenética, sob condições ótimas fornece uma resolução de um evento evolutivo por 0,2 - 0,3 milhão de anos, permitindo uma primeira aproximação do curso da evolução de organismos procariotos (LUDWIG & SCHLEIFER, 1999).

A taxa evolutiva das seqüências varia extensivamente com o gene ou segmento de DNA (WILSON *et al.*, 1977), por este estar sob pressão de seleção. Isto significa que algumas seqüências mudam rápido o suficiente para mostrar variação significativa ao nível intraespecífico, considerando que estas seqüências são cruciais

para a função, são altamente conservadas e permanecem reconhecíveis em todos os organismos. Esta variação em taxa permite comparações de seqüências, se bem escolhidas, para serem úteis em todos os níveis de resolução taxonômicos, (YOUNG, 1992).

Utilizando a molécula de 16S rDNA como marcador filogenético, CRUZ (2001) identificou cerca de 40 isolados diazotróficos de abacaxizeiro e bananeira como pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Azospirillum* e *Ochrobactrum* e família *Comamonadaceae*. Entretanto, a diferenciação dos isolados em nível específico utilizando como marcador o 16S rDNA permaneceu indefinida, devendo-se em parte, pelo alto grau de conservação intragênero do marcador. No presente trabalho, propomos a utilização do 23S rDNA como marcador filogenético para a identificação dos isolados de abacaxizeiro e bananeira e suprir a falta de dados em relação a estirpes referência de *Herbaspirillum* spp., *Burkholderia* spp. e *Azospirillum* spp. no nível específico.

2 OBJETIVOS

Análise da diversidade de isolados diazotróficos endofíticos de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) e bananeira (*Musa* spp.) usando como marcador molecular o gene para 23S rRNA (23S rDNA) e análise comparativa com dados de 16S rDNA.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Construir *primers* para amplificação e seqüenciamento do 23S rDNA de bactérias diazotróficas endofíticas;
- b) Determinar as condições ótimas para amplificação do 23S rDNA;
- c) Amplificar o 23S rDNA de isolados diazotróficos endofíticos de abacaxizeiro e bananeira;
- d) Analisar comparativamente o perfil de restrição dos amplificados;
- e) Seqüenciar os amplificados e identificar os isolados através de análises filogenéticas
- f) Análise genômica

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTIRPES USADAS

As bactérias diazotróficas usadas no presente trabalho foram isoladas de caule, pseudocaule, folhas, raízes e frutos de abacaxizeiro e bananeira cultivadas nos estados da Bahia e Rio de Janeiro e classificadas por análise do 16S rDNA segundo CRUZ (2001). As estirpes de bactérias diazotróficas usadas como referência: *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BALDANI *et al.*, 1996), *Burkholderia brasilensis* (nome proposto; HARTMANN *et al.*, 1995) e *Burkholderia tropicalis* (nome proposto; BALDANI *et al.*, 1997) foram obtidas da coleção do Núcleo de Fixação Biológica de Nitrogênio - UFPR, PR.

TABELA 1 - BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ISOLADAS DE ABACAXIZEIRO (*ANANAS COMOSUS*) E BANANEIRA (*MUSA SPP.*) CULTIVADOS NOS ESTADOS DA BAHIA (BA) E RIO DE JANEIRO (RJ) E OUTRAS ESTIRPES UTILIZADAS

ESTIRPE	HOSPEDEIRO	CULTIVAR	TECIDO	ORIGEM
AB48	abacaxizeiro	Perolera	raiz	Cruz das Almas/ BA
AB98	abacaxizeiro	Pérola	fruto	Macaé/ RJ
AB120	abacaxizeiro	Pérola	caule	Macaé/ RJ
AB147	abacaxizeiro	Smooth Cayenne	caule	Quissamã/ RJ
BA10	bananeira	Butuhan	pseudocaule	Cruz das Almas/ BA
BA14	Bananeira			
BA17	bananeira	Butuhan	pseudocaule	Cruz das Almas/ BA
BA22	bananeira	Prata Anã	folhas	Cruz das Almas/ BA
BA87	bananeira	Maçã	folhas	Itaguaí/ RJ
BA104	bananeira	Prata Anã	pseudocaule	Itaguaí/ RJ
BA136	bananeira	Prata	folhas	Itaguaí/ RJ
BA149	bananeira	Maçã	folhas	Itaguaí/ RJ
BA153	bananeira	Marmelo	fruto	Itaguaí/ RJ
Outras bactérias utilizadas nos experimentos				
M130	Burkholderia brasiliensis			
Ppe8	Burkholderia tropicalis			
Ala	Azospirillum spp.			
X8	Herbaspirillum spp.			
Y1	Azorhizobium amazonense			
Y2				

3.2 CULTIVO DAS ESTIRPES

As estirpes foram cultivadas durante a noite (~12h) em frascos de 25 mL contendo 5 mL de meio líquido específico ou frascos de 60 mL contendo 20 mL de meio, a 30 °C e 120 rpm.

Abaixo estão indicados os meios de cultivo específicos usados para cada gênero. Todos os meios de cultivo receberam adição de 20 mmol/L de NH_4Cl .

Composição do meio NFbHPN malato (MACHADO *et al.*, 1991) para cultivo de estirpes de *Herbaspirillum* spp. :

Quantidades suficientes para o preparo de 1,0 litro de meio:

Ácido málico	5,0 g
K_2HPO_4	0,5 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
Solução de micronutrientes (ver abaixo)	2,0 mL
FeEDTA (solução 1,64%)	4,0 mL
Solução de vitaminas (ver abaixo)	1,0 mL
KOH	4,5 g

O pH foi ajustado para 6,5 – 6,8 com NaOH.

Estirpes de *Azospirillum* spp. foram cultivadas em meio NfbHPN contendo lactato no lugar de malato como fonte de carbono.

Composição do meio JMV (BALDANI, 1996) para cultivo de estirpes de *Burkholderia* spp. (Quantidades suficientes para 1 litro de meio):

Manitol	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,6 g
KH ₂ PO ₄	1,8 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2 g
Solução de micronutrientes (ver abaixo)	2,0 mL
Fe EDTA solução 1,64%	4,0 mL
Solução de vitaminas (ver abaixo)	1,0 mL

O pH foi ajustado para 4,2 – 4,5 e foram adicionados 100 mg de extrato de levedura. O meio foi esterilizado por autoclavagem e foram adicionados 10 mmol/ L de glutamato de sódio no momento do uso.

Solução de micronutrientes para meio de cultivo (DÖBEREINER *et al.*, 1995). Quantidades suficientes para 200 mL de solução:

Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,235 g
H ₃ BO ₃	0,28 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,008 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,024 g

Solução de vitaminas para meio de cultivo (DÖBEREINER *et al.*, 1995).

Quantidades suficiente para 100 mL de solução:

Biotina 10 mg

Pyridoxol – HCl 20 mg

Dissolvidos em banho-maria.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA CROMOSSÔMICO

Cerca de 20 mL da massa celular de cultura bacteriana foi coletada por centrifugação a 13.000 x g por 30 – 60 s e ressuspendida em 500 µL de tampão GET (50 mmol/ L de Glucose, 25 mmol/ L de Tris HCl pH 8,0 e 10 mmol/ L de EDTA pH 8,0). Em seguida, lisoizima foi adicionada para uma concentração final de 300 µg/ mL e a mistura incubada a 37 °C por 30 min. Entre 100 - 200 mL de solução SDS (sódio dodecil sulfato) a 10% e pronase E e RNase para uma concentração final de 200 µg/ mL e 50 µg/ mL, respectivamente, foram adicionados em seguida e a mistura mais uma vez incubada a 37 °C durante a noite. Cerca de 300 µL da mistura fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (na proporção de 25:24:1) foi adicionada e os tubos gentilmente agitados por cerca de 15 min. A emulsão foi centrifugada a 13.000 x g por 10 min e a fase superior retirada com o auxílio de pipeta automática e transferida para tubos plásticos de 1,5 mL. Uma nova extração foi feita, desta vez com 1 volume de clorofórmio; a emulsão foi então centrifugada a 13.000 x g por 10 min e a solução sobrenadante retirada com o auxílio de micropipetador e transferida para um novo tubo plástico de 1,5 mL. Dois volumes de etanol absoluto foram adicionados e o tubo gentilmente invertido por várias vezes até a completa precipitação do DNA, que foi então retirado com a ajuda de uma alça de vidro capilar, lavado com etanol 80% e

transferido para um novo tubo plástico de 1,5 mL. O excesso de etanol foi retirado em dessecador a vácuo. O DNA foi ressuspensionado em água estéril (Milli Q), quantificado espectrofotometricamente em luz UV a 260 nm e estocado a 4 °C.

3.4 RESTRIÇÃO DO DNA CROMOSSOMAL POR ENDONUCLEASES DE RESTRIÇÃO E ELETROFORESE

Uma quantidade de 10 µg de DNA genômico de cada um dos isolados foi digerido separadamente com 3 endonucleases de restrição (*EcoRI* 5' G[^]AATTC 3', *HindIII* 5' A[^]AGCTT 3', *NcoI* 5' C[^]CATGG 3'), por aproximadamente 15 horas em estufa a 37°C. As reações foram feitas num volume total de 100 µL na presença de tampão apropriado: NEBufferTM (450 mmol/L acetato de potássio, 20 mmol/L Tris-acetato, 10 mM acetato magnésio, 1 mmol/L ditioneitol (pH 7.9 a 25°C)).

Após a digestão com endonucleases 40 µL da amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose 0,7% a 60 volts por 5 horas.

3.5 DESENHO DOS INICIADORES PARA 23S rDNA

Entre 12 a 14 iniciadores foram desenhados para serem usados nas etapas de amplificação e/ ou seqüenciamento do 23S rDNA. O desenho destes iniciadores foi feito a partir do alinhamento de seqüências do 23S rDNA de espécies das subdivisões das Proteobactérias disponíveis em banco de dados público. Uma busca visual por regiões conservadas para anelamento de iniciadores foi feita. Levando-se em consideração a temperatura de fusão (T_m) entre 55 e 60 °C, o mais semelhante possível entre estes iniciadores, para que pudessem ser usados em um único ciclo de temperaturas para a PCR. Foi feita também a escolha de um número mínimo de iniciadores, cobrindo regiões equidistantes, e capazes de permitir o seqüenciamento de

toda a região do 23S rDNA com uma área de sobreposição entre elas suficiente para a montagem das seqüências contíguas com precisão. Foi dada atenção também a fatores como o anelamento entre os iniciadores, o que pode ser prejudicial às etapas de amplificação e seqüenciamento.

3.6 AMPLIFICAÇÃO DO 23S RDNA

DNA cromossômico foi adicionado ao tampão de reação da *Taq* DNA polimerase (10 mmol/ L de Tris-HCl pH 9 e 50 mmol/ L de KCl) diluído 10 vezes, 1,5 mmol/ L de MgCl₂, de acordo com recomendação do fabricante (Invitrogen), dATP, dTTP, dCTP e dGTP (dNTP), par de iniciadores direto e reverso e *Taq* DNA polimerase. A solução foi completada para um volume final de 50 µL com água milli Q estéril. A concentração de dNTP, a concentração e fonte da *Taq* DNA polimerase, a concentração e combinação de iniciadores e o ciclo de temperaturas variou de acordo com o experimento e encontram-se especificados em cada caso nos resultados.

Após a reação de amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agar 1,0% (~6 V/cm por aproximadamente 40 min.), coradas com 0,5 µg/ mL de brometo de etídeo por 15 min e fotografadas sob luz UV para avaliação do amplificado com relação ao sucesso da reação, tamanho e concentração aproximada.

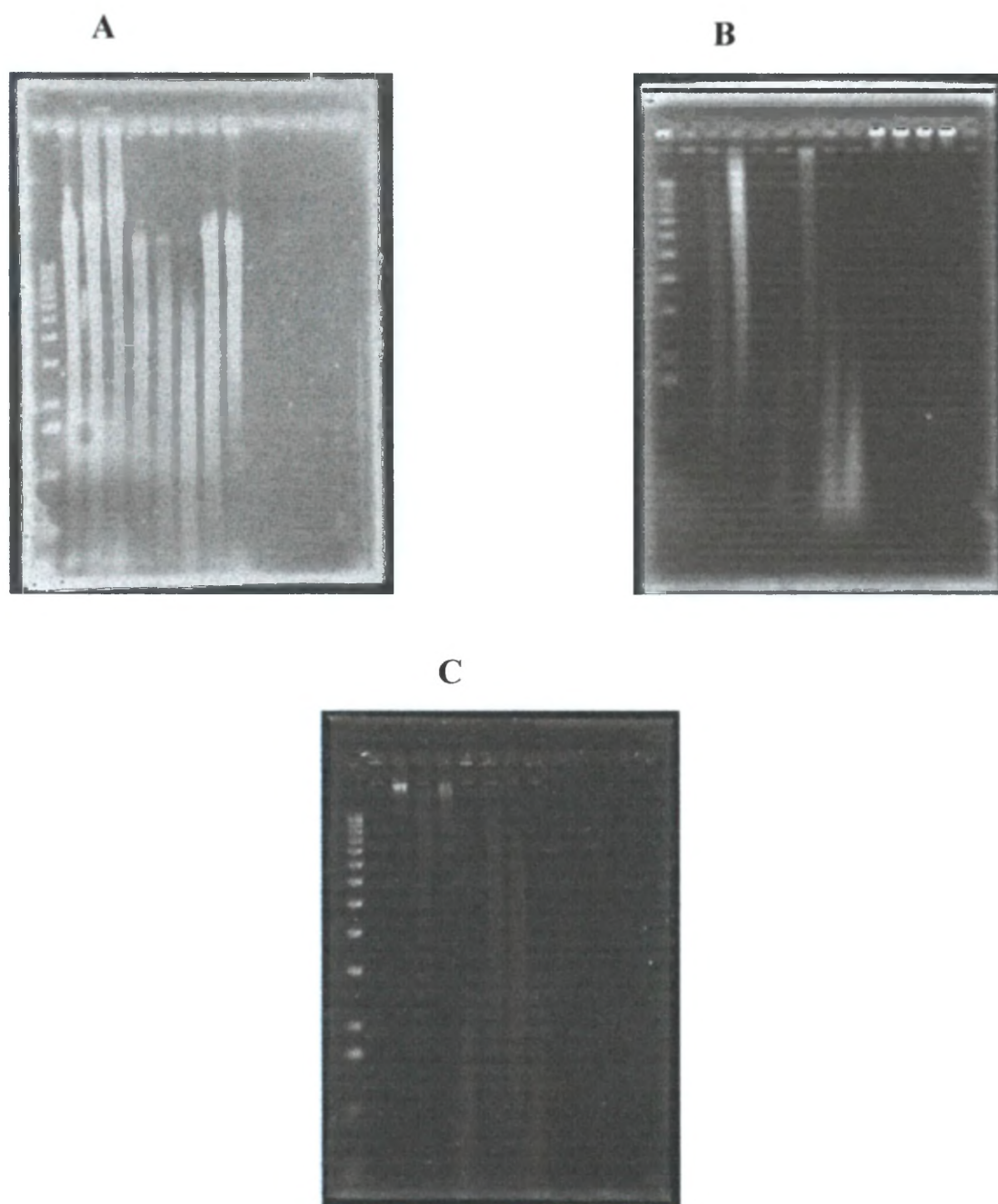
4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DOS PERFIS DE RESTRIÇÃO

O DNA genômico das estirpes BA10, AB120, AB48, AB98, BA153, M130, BA87 e BA104 foi extraído e tratado com enzimas de restrição como apresentado no item Material e Métodos. A análise dos perfis de restrição do DNA genômico destes isolados (figura 1) pode ser útil para estabelecer a proximidade entre eles, uma vez que a conservação dos sítios de restrição pode ser usada como um indicativo de homologia entre seqüências.

A análise dos padrões de restrição com a enzima *EcoRI* revela semelhanças entre a fragmentação ocorrida nos genomas dos isolados BA87 e BA104, AB120 e AB48, sugerindo a ocorrência de sítios de restrição conservados para esta enzima. O padrão de restrição para a enzima *NcoI* revela semelhanças apenas entre os isolados BA87 e BA104, a exemplo do experimento com *EcoRI*. Entretanto, observa-se diferença nos padrões de restrição do isolado AB48 e da estirpe M130 de *Burkholderia brasilensis*. A restrição do DNA genômico destas mesmas estirpes com *HindIII* mostra um padrão semelhante de restrição entre os isolados BA153 e BA104 e, possivelmente entre a estirpe M130 e o isolado BA87, demonstrando que estes genomas têm os mesmos sítios de restrição para esta enzima.

Figura 1. Perfis de restrição dos DNA genômicos de bactérias endofíticas diazotróficas isoladas de abacaxizeiro e bananeira.



A, Perfil de restrição obtido por tratamento com *EcoRI*; B, Perfil de restrição obtido por tratamento com *NcoI*; C, Perfil de restrição obtido por tratamento com *HindIII*.

Ordem dos poços (igual para os três géis – da esquerda para a direita): 1. 1 KB DNA ladder, 2. BA10, 3. AB120, 4. AB48, 5. AB98, 6. BA153, 7. M130, 8. BA87 e 9. BA104.

4.2 CONSTRUÇÃO DOS INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 23S rDNA

A sequência dos iniciadores para a amplificação do gene de 23S rDNA foi obtida a partir das sequências de nucleotídeos de 23S rRNA alinhadas, disponíveis no banco de dados *European ribosomal RNA database* (<http://oberon.fvms.ugent.be:8080/rRNA/>). A partir do alinhamento das sequências do gene de 23S rDNA disponíveis para as subdivisões alfa, beta, gama, delta e epsilon da divisão das Proteobactérias uma sequência consenso foi gerada para cada uma das subdivisões (apêndice 8.2). Porém estas sequências consenso podem ser modificadas com o aumento do número de sequências que é depositada no banco de dados consultado, pois, por exemplo, o consenso da subdivisão gama contou com o alinhamento de setenta e quatro representantes, ao passo que o consenso da subdivisão delta foi obtido a partir do alinhamento de dois representantes desta subdivisão (apêndice 8.2). Cada sequência consenso foi construída da seguinte forma: quando há a presença de uma mesma base (A, C, G ou T) em mais de 70% dos organismos que estão sendo alinhados (este parâmetro é selecionado pelo usuário do programa), o programa *Bioedit* inclui esta base como parte da sequência consenso. Quando esta base não faz parte de pelo menos 70% das sequências alinhadas, um ponto de interrogação é adicionado na sequência consenso na posição exata desta base nas sequências dos organismos pesquisados. As sequências consenso obtidas para as cinco subdivisões das proteobactérias foram alinhadas juntamente com a sequência do gene de 23S rDNA obtida a partir de dados do sequenciamento genômico de *H. seropedicae*, programa GENOPAR (www.genopar.com.br). Todos os clones contendo homologia com sequências para 5S, 16S e 23S rRNA, identificados a partir de pesquisa de similaridade com o₂₄

programa BLAST, foram selecionados e os contigs montados com o pacote de programas Phred/Phrap/Consed. A sequência contígua, ou o *contig*, que continha o operon de rRNA da bactéria *H. seropedicae* foi identificada (dados não mostrados) e a região que continha a sequência de 23S rDNA foi selecionada para o alinhamento com as sequências dos consensos das subdivisões das Proteobactérias (Apêndice 8.2).

As sequências dos iniciadores foram escolhidas a partir da inspeção visual deste alinhamento e posteriormente analisadas quanto a características indesejáveis, tais como pareamento interno de bases, pareamento cruzado entre iniciadores. A escolha dos iniciadores baseou-se também na sua maior abrangência possível entre as subdivisões das Proteobactérias, mas dando atenção especial à subdivisão beta. Cuidados foram tomados também na escolha de bases C e/ou G na ponta 3' dos iniciadores e temperaturas de fusão (T_m) o mais próxima possível. Os iniciadores escolhidos e algumas de suas características são apresentadas na tabela 2 e suas posições em relação ao operon rRNA de *H. seropedicae* são mostradas na figura 2. Dentre os 12 iniciadores escolhidos, os iniciadores 23S130F, 23S1623F, BLR1686/20 e 23S2758R foram sintetizados (Invitrogen) e testados para amplificação do 23S rDNA de isolados diazotróficos endofíticos de abacaxizeiro e bananeira.

Apesar dos cuidados, entretanto, nem todos os iniciadores têm uma sequência de bases idêntica à sequência de todas as subdivisões, pois mesmo dentro e entre as subdivisões podem ocorrer grandes variações. As estirpes de bactérias utilizadas neste trabalho pertencem todas à subdivisão beta, à exceção de duas estirpes de *Azorhizobium*, portanto nem todos os iniciadores têm uma sequência exata ao 23S rRNA desta subdivisão como, por exemplo, o iniciador BLR1686/20 (Apêndice 8.2) que mostra diferença em uma base da sequência. Este fato sugere que a falta de similaridade pudesse estar interferindo nos experimentos de amplificação, pois esta falta de similaridade entre iniciador e o DNA molde perde sua especificidade. A figura

3 mostra o resultado para um experimento de amplificação do 23S rDNA com os iniciadores 23S130F e 23S2758R. Estes iniciadores possuem região de anelamento nas pontas 5' e 3' do gene, respectivamente, e permitem a amplificação quase completa do 23S rDNA. Entretanto, somente foi observado a amplificação de um fragmento de DNA correspondente ao tamanho esperado, de aproximadamente 3,0 Kb para as estirpes de *Azorhizobium amazonense* (Y1 e Y2) testadas, pertencentes à subdivisão alfa das proteobactérias, que mostraram um bom resultado. Porém, há também a evidência de amplificação de bandas inespecíficas (entre 1,0 e 1,6 Kb) em todas as amplificações, provavelmente originárias de DNA contaminante, uma vez que seu tamanho corresponde àquele observado para a banda que aparece no tubo branco (sem DNA).

TABELA 2. PRIMERS PARA AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DO 23S RDNA.

NOME ¹	SEQUÊNCIA (5' → 3')	COMPRIMENTO	PM ⁴	GC% ⁴	T _m (°C) ⁴
Direto					
23S130f	GATTTCCGAATGGGGAAACC	20 pb	6161	50	56
23S1075f	GGATGTTGGCTTAGAAGCAGC	21 pb	6519	52	59
BLF463/20 ²	CCGATAGTGAACCAGTACCG	20 pb	6107	55	58
23S1623f	CCCCNAACCGACACAGGTGG	20 pb	5764	68	62
23S2067f	GGCNAGACGGAAAGACCCCG	20 pb	5851	68	62
23S2515f	GCACCTCGATGTCGGCTCATC	21 pb	6354	62	63
Reverso					
23S2758r	GATAAGTGCTGAAAGCATCT	20 pb	6161	40	52
23S2253r	GGTGGGTAGTTTGACTGGGG	20 pb	6290	60	60
BLR1686/20 ³	GAAGTAGGCAAAATGGTGCC	20 pb	6170	50	56
23S1315r	GCCGGAAGACCAAGGGTTCC	20 pb	6146	65	62
23S708r	AGCCATGGGCAGGTTGAAGG	20 pb	6239	60	60
23S216r	ACATCTAAGTACCCCGAGGA	20 pb	6092	50	56

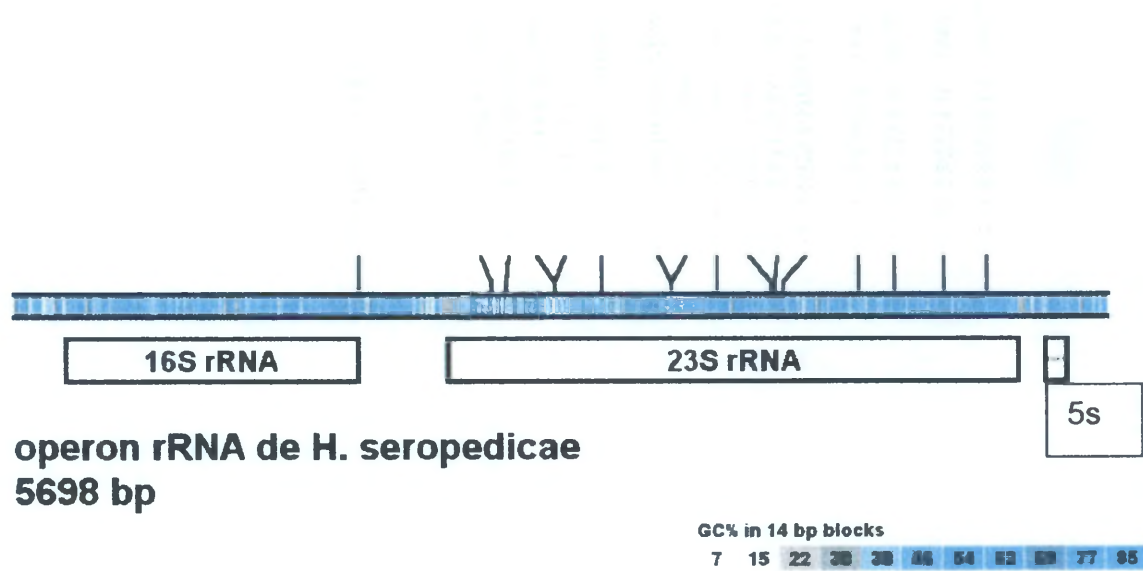
¹ Os nomes foram compostos da seguinte maneira: 23S - derivado do 23S rDNA; números seguintes - posição da última base da ponta 3' na sequência do 23S rDNA de *E. coli* K12 (gene *rrlB*); "f" ou "r" - iniciador direto ou reverso, respectivamente.

² O iniciador BLF463/20 foi modificado; originalmente este iniciador possuía o sentido reverso (nome original: BLR463/20); Fonte: <http://oberon.rug.ac.be:8080/rRNA/>.

³ Fonte: <http://oberon.rug.ac.be:8080/rRNA/>

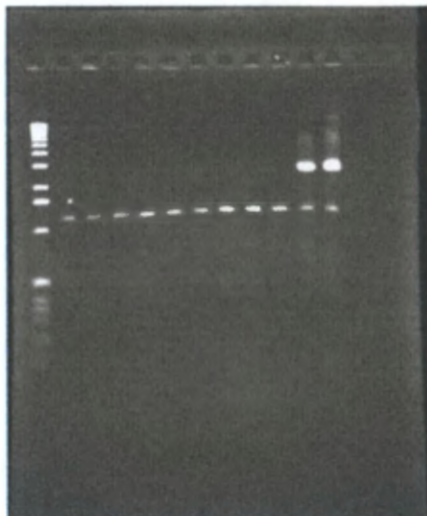
⁴ Os parâmetros físicos foram calculados utilizando-se o programa OligoCalc disponível online . <http://www.justbio.com/>

FIGURA 2. ORGANIZAÇÃO DO OPERON DE RNA RIBOSSOMAL DE *H. SEROPEDICAE*.



Dados obtidos do Programa de seqüenciamento genômico da bactéria fixadora de nitrogênio *H. seropedicae* - GENOPAR.

FIGURA 3. AMPLIFICAÇÃO DO 23S RDNA DE ISOLADOS DE ABACAXIZEIRO E BANANEIRA E ESTIRPES Y1 E Y2 DE *AZORHIZOBIUM AMAZONENSE*.



Ordem dos poços (da esquerda para a direita): 1. 1KB DNA ladder, 2. Branco, 3. BA17, 4. BA149, 5. BA136, 6. AB147, 7. BA14, 8. BA22, 9. BA153, 10. BA17, 11. Y1 e 12. Y2.

Ciclo de temperaturas: 1 etapa - 95 °C/ 1 min; 2 etapa - 94 °C/ 1 min, 55 °C/ 30 s e 72 °C/ 2 min, 35 vezes; 3 etapa - 72 °C/ 5 min.

4.3 AMPLIFICAÇÃO DO 23S rDNA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS

Devido à impossibilidade de se obter amplificados para o 23S rDNA a partir das condições da PCR e utilizando o par de iniciadores 23S130F/23S2758R, apresentadas no item anterior, diversas combinações entre reagentes, ciclo de temperaturas, DNA molde e combinação de iniciadores foram testadas com o intuito de otimizar a reação de amplificação. Através da técnica de Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), desejava-se obter amplificado, parcial ou totalmente, o gene que codifica para o RNA ribossômico de 23S (23S rDNA) de bactérias diazotróficas endofíticas isoladas de abacaxizeiro e bananeira e estirpes de *Herbaspirillum* spp. e *Azorhizobium* spp. As combinações de iniciadores testadas e os tamanhos esperados para os fragmentos amplificados estão apresentados na tabela 3.

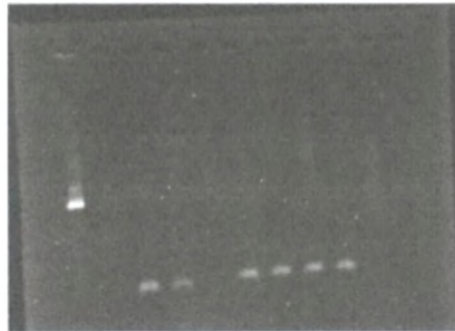
A reação de PCR preparada com tampão para Taq DNA polimerase IX, MgCl₂ 1,5 mmol/L, dNTP 200 µmol/L, 5 pmol de cada iniciador, 1,5 µL de Taq DNA polimerase (concentração desconhecida – enzima produzida no Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR) e cerca de 10 ng de DNA molde, onde a combinação de iniciadores 23S130F e p23 foi usada, resultou na amplificação de um fragmento entre 300 e 400 pb, como esperado, para as diversas estirpes testadas (figura 4). Para esta amplificação foi usado o seguinte ciclo de temperaturas: 1 ciclo de fusão a 94 °C por 3 min; 35 ciclos de fusão a 94 °C por 45 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min; e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 min.

TABELA 3: COMBINAÇÕES DE INICIADORES PARA AS REAÇÕES DE PCR

Par de Iniciadores	Estimativa do amplificado ¹	Observação
23S130F - BLR1686/20	1.520 pb	Amplifica aproximadamente a metade 5' do 23S rDNA.
23S1623F - 23S2758R	1.040 pb	Amplifica aproximadamente a metade 3' do 23S rDNA.
23S130F - 23S2758R	2.640 pb	Amplifica quase totalmente o 23S rDNA.
PHR - p23	1.120 pb	Amplifica toda a região intergênica entre o 16S e o 23S rDNA e mais cerca de 300 pb do 23S rDNA.
23S130F - p23	371 pb	
1440 - 23S2758R	~ 1318 pb	
317 - 939	~ 622 pb	
23S130F - 1440	~ 1.310 pb	
317 - 23S2758R	~ 2.441 pb	
939 - 23S2758R	~ 1.819 pb	

¹ Para as combinações contendo os iniciadores 23S130F, BLR1686/20, 23S1623F e 23S2758R a estimativa baseou-se na sequência do operon rRNA de *Herbaspirillum seropedicae* mostrada no Apêndice. Para as combinações contendo os iniciadores 317, 939, 1440 a estimativa baseou-se na posição, indicada pelos números, de anelamento no 23S rDNA de *E. coli*.

FIGURA 4: AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE 23S RDNA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS COM O PAR DE INICIADORES 23S130F/P23.



Ordem dos poços (da esquerda para a direita): 1. 16S rDNA (marcador), 2. BA104, 3. BA87, 4. M130, 5. A3b, 6. BA153, 7. AB48, 8. Z67, 9. A2A, 10. RS4 e 11. controle (sem DNA).

CICLO DE TEMPERATURAS: 1 etapa. 93 °C/ 3 min; 2. 93 °C/ 30 s, 48 °C/ 1 min, 72 °C/ 2 min e 30 s 30X; 3. 72 °C/ 10 min.

FIGURA 5: AMPLIFICAÇÃO PARCIAL DO GENE 23S RDNA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS.



Nas reações da parte superior do gel foi usado o par de iniciadores 1440 / 23S2758R e nas reações da parte inferior o par 317 / 939.

Ordem dos poços da parte superior (da esquerda para a direita): 1. 16S rDNA - X8 (marcador), 2. branco (sem DNA), 3. M130, 4. Ala, 5. Z67, 6. Ppe8, 7. BA87, 8. BA153, 9. BA10, 10. AB98, 11. BA104, 12. vazio, 13. vazio, 14. vazio.

Ordem dos poços da parte inferior (da esquerda para a direita): 15. 16S rDNA - X8 (marcador) 16. branco (sem DNA) 17. M130 18. Ala 19. Z67 20. Ppe8 21. BA87 22. BA153 23. BA10 24. AB98 25. BA104 26. vazio 27. vazio 28. vazio.

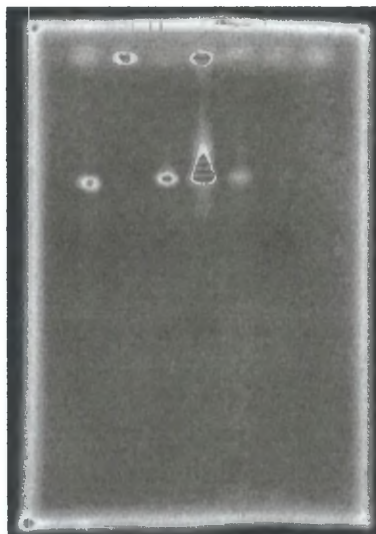
Uma segunda combinação de iniciadores foi também usada na tentativa de amplificar o 23S rDNA dos isolados com os iniciadores designados como 317 (5'-GTGTCGGTTTGGGGTA-3' - direto), 939 (5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3' - reverso) e 1440 (5'-GTTGGCTTAGAAGCAGCC-3' - direto), correspondentes aos respectivos sítios de anelamento no 23S rDNA de *E. coli* (DIDONET, comunicação pessoal). As seguintes combinações, destes com os iniciadores construídos no presente trabalho, foram testadas: 317/939, 23S130F/23S2758R, 23S130F/1440, 317/23S2758R e 939/23S2758R. Entretanto, nenhuma destas combinações resultou em material amplificado (dado não mostrado). Estas reações foram feitas com a seguinte mistura de reagentes: tampão 1X, MgCl₂ 1,5 mmol/L, dNTP 200 µmol/L, iniciadores 10 pmol, Taq DNA polimerase 1 U (*Recombinant* – Invitrogen) e DNA molde (isolado AB48) 50 ng e foi conduzida com o seguinte ciclo de temperaturas: 1 ciclo de fusão a 94 °C por 3 min; 35 ciclos de fusão a 94 °C por 45 s, anelamento a 58 °C por 45 s e extensão a 72 °C por 2 min; e um ciclo final de extensão a 72 °C por 10 min. Somente o uso do par 1440/23S2758R (figura 5) produziu material amplificado, mas apenas para as estirpes Ala de *Azospirillum* spp., Z67 de *Herbaspirillum seropedicae* e Ppe8 de *Burkholderia tropicalis* dentre as 9 testadas. O fragmento amplificado possui o tamanho aproximado do 16S rDNA, usado como marcador na figura 5.

4.3.1 Variação na concentração de *Taq* DNA polimerase e DNA molde

Grande parte dos experimentos de amplificação foram executados utilizando uma enzima *Taq* DNA polimerase própria, nativa e clonada em *E. coli*, produzida e purificada no Núcleo de Fixação de Nitrogênio da UFPR. A atividade da enzima não foi determinada e na tentativa de otimizar as reações de PCR reações com uma quantidade crescente de enzima e de DNA foram adicionados a uma bateria de quatro tubos. As condições para a reação da PCR foram: tampão 1X, MgCl₂ 1,5 mM,

dNTP 200 $\mu\text{mol/L}$ e par de iniciadores 23S130f/23S2758r 10 pmol. O DNA usado como molde foi extraído conforme especificado no item Material e Métodos a partir de cultura em meio líquido do isolado X8. A figura 6 mostra o resultado das amplificações para as concentrações do DNA molde e *Taq* DNA polimerase. Entretanto, houve amplificação da amostra controle (sem adição de DNA), indicando contaminação de algum dos reagentes usados no experimento.

FIGURA 6. CURVA DE CONCENTRAÇÃO DE TAQ DNA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DO 23S RDNA DO ISOLADO X8.



Ordem dos poços (da esquerda para a direita): 1. 10 ng/ μ L de DNA e 1 μ L de Taq, 2. 20 ng/ μ L de DNA e 1,5 μ L de Taq, 3. 30 ng/ μ L de DNA e 2 μ L de Taq, 4. 40 ng/ μ L de DNA e 3 μ L de Taq, 5. sem DNA e 1 μ L de Taq (controle).

4.3.2 Curva de temperatura

Um experimento para determinação da T_m ótima de anelamento dos iniciadores foi realizado utilizando-se um gradiente de temperatura, onde esta variou em ± 2 °C em relação à temperatura de anelamento pré-estabelecida em 58 °C para uma bateria de doze tubos. Nestes experimentos o DNA usado como molde foi aquele do isolado BA153 e a mistura de reagentes foi a seguinte: tampão 1X, $MgCl_2$ 1,5 mmol/L, dNTP 200 μ mol/L, 10 pmol de cada iniciador (23S130F e 23S2758R), 1,0 μ L de Taq DNA polimerase, 10 ng de DNA e água milliQ para um volume final de 50 μ L. O ciclo de temperaturas usado foi o seguinte: 1 ciclo de fusão a 95 °C por 1 min; 35 ciclos de fusão a 94 °C por 1 min, anelamento variável por 30 s e extensão a 72 °C por 2 min; 1 ciclo final de extensão a 72 °C por 5 min. A reação foi conduzida em termociclador Eppendorf, modelo Mastercycler Gradient onde foi automaticamente estabelecido o gradiente de temperaturas: 56,0 °C, 56,1 °C, 56,3 °C, 56,7 °C, 57,1 °C, 57,6 °C, 58,2 °C, 58,7 °C, 59,2 °C, 59,7 °C, 60,0 °C e 60,2 °C. Entretanto, neste experimento não se obteve amplificações sob nenhuma das temperaturas de anelamento testadas, portanto, através dele não foi possível avaliar qual a melhor temperatura deveria ser usada para o anelamento entre os pares de iniciadores testados. Nem mesmo nas temperaturas estridentes de 56 °C houve o aparecimento de bandas de amplificação.

5 DISCUSSÃO

5.1 RESTRIÇÃO DE DNA CROMOSSOMAL

Os experimentos de digestão de DNA cromossomal com enzimas de restrição mostraram diferenças na distribuição dos sítios de restrição para estas enzimas no genoma das estirpes utilizadas, o que pode ser evidenciado pelo padrão diferenciado que o DNA digerido destas estirpes apresentou. Entretanto, por não gerar padrões claros que permitam estabelecer a diferenciação qualitativa e quantitativamente entre os genomas testados, este parâmetro apresenta certos limites de comparação. Experimentos posteriores, como experimentos de hibridização, no qual um gene de interesse, como o 23S rDNA, é usado como uma sonda para revelar possíveis diferenças entre os genomas analisados serão úteis na resolução deste problema. Todos os géis apresentados para restrição do DNA cromossomal foram transferidos para membranas de nitrocelulose (dados não mostrados) para posterior análise de hibridização com sondas de 23S rDNA marcadas radioativamente.

5.2 AMPLIFICAÇÃO DO 23S RDNA

Diversos isolados diazotróficos endofíticos associados a abacaxizeiro e bananeira foram classificados com base em análise de RFLP e seqüenciamento do 16S rDNA (CRUZ, 2001). Entretanto, esta classificação mostrou-se ambígua em alguns aspectos (CRUZ, 2001). Na tentativa de aumentar a resolução desta classificação e identificação dos isolados diazotrófico endofíticos, foi usado o gene que codifica para o 23S rRNA (23S rDNA) como marcador genético.

A molécula de 23S rDNA possui as mesmas características úteis para seu uso como marcador genético que a molécula do 16S rDNA, mas é, aproximadamente, duas

vezes mais longa em número de nucleotídeos e, conseqüentemente, em informação o que, em teoria, pode permitir a resolução das ambigüidades encontradas nas análises através do 16S rDNA.

Para o uso do 23S rDNA, a construção de oligonucleotídeos iniciadores foi necessária. Estes iniciadores foram construídos a partir do alinhamento entre as seqüências de diversas espécies distribuídas entre as subdivisões alfa, beta, gama, delta e epsilon das Proteobactérias. As seqüências destes iniciadores, algumas vezes não possuem uma 100% de identidade em relação ao DNA molde, o que pode interferir na obtenção do resultado. A quantidade de seqüências para 23S rDNA disponíveis nos bancos de dados públicos é variável e muito desigual para as subdivisões das Proteobactérias. Por exemplo, as subdivisões gama e alfa contam com 74 e 40 seqüências, respectivamente, enquanto as subdivisões beta e epsilon contam somente com 23 e 12 seqüências, respectivamente, ao passo que a subdivisão delta tem apenas 2 seqüências (Apêndice 8.2). As seqüências consenso que serviram de apoio à construção destes oligonucleotídeos iniciadores, portanto, podem não ser absolutamente representativas do gene de 23S rDNA em cada uma das subdivisões das próteobactérias. Porém com o aumento do número de seqüências que tornem-se disponíveis nos bancos de dados, pode haver uma otimização na construção destas seqüências consenso para posterior sintetização de novos e mais precisos iniciadores.

Para determinar quais condições são ideais para a amplificação do 23S rDNA foi necessário realizar muitas combinações de iniciadores e variações nas condições da PCR. As condições ideais à amplificação do gene nas estirpes escolhidas, entretanto, ainda não foram atingidas. A construção dos iniciadores utilizados neste trabalho procurou atingir uma possível generalização na sua utilização para os representantes das proteobactérias, mais precisamente os da subdivisão beta, de acordo com o item 4.2, “Construção dos iniciadores para amplificação e seqüenciamento do

23S rDNA”. Uma aparente contradição surge neste ponto. A amplificação do gene das estirpes utilizadas para os experimentos (tabela 1), as quais pertencem à subdivisão beta, não foi conseguida, a não ser por uma pequena parte de aproximadamente 300 pares de bases do gene (figura 4). Já com duas estirpes representantes de *Azorhizobium* a amplificação do 23S rDNA mostrou-se possível, apesar desta estirpe ser uma representante da subdivisão alfa das proteobactérias. Diversos fatores podem estar contribuindo, como: temperatura de anelamento, inespecificidade de alguns iniciadores, entre outros. A amplificação de fragmentos com tamanho esperado para o par de iniciadores 23S130F/23S2758R em estirpes de *Azorhizobium*, sugere uma maior especificidade destes com a subdivisão alfa das Proteobactérias, fato não justificado quando as seqüências são levadas em consideração (Anexo 7.2). Entretanto estes dados não foram 100% reprodutíveis. Por outro lado, o iniciador 23S130F funcionou bem quando usado com o iniciador p23. Da mesma forma, o iniciador 23S2758R resultou em amplificação quando usado com o iniciador 1440, mas, neste caso, apenas as estirpes Ala, Z67 e Ppe8. Mesmo usando temperaturas de anelamento menos estridentes não foi possível obter amplificadas na maioria dos casos.

6 CONCLUSÕES

Os experimentos de digestão de DNA cromossomal com enzimas de restrição revelaram parte da diversidade dos isolados diazotróficos endofíticos. O padrão de restrição refletido no gel revela semelhanças e também diferenças entre os genomas destas estirpes, de acordo com a posição diferencial dos sítios de restrição em cada um destes genomas.

Dezesseis iniciadores foram construídos a partir de dados do alinhamento de seqüências de representantes das proteobactérias disponíveis no banco de dados *European ribosomal RNA database*. A construção destes iniciadores procurou visar a seqüência do gene de 23S rDNA de beta Proteobactérias, entre elas o gênero *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. Porém, estes iniciadores deveriam ter também um pareamento de bases razoável com outras Proteobactérias de maneira a funcionarem com iniciadores universais. Nos experimentos realizados, no entanto, houve muita dificuldade para conseguir a amplificação destes isolados, o que pode levar também a suspeita que a falta de pareamento total entre iniciador e DNA molde possa ter prejudicado os experimentos de amplificação.

A temperatura ótima de anelamento dos iniciadores não pôde ser determinada com absoluta precisão através dos experimentos realizados neste trabalho, pois havia muitas variações entre os iniciadores usados. Apesar das várias tentativas na variação dos ciclos de temperatura normais que vinham sendo usados e do experimento da curva de temperatura não se pôde concluir qual a temperatura ideal. Apenas com os experimentos de amplificação parcial do 23S rDNA foi possível estabelecer uma temperatura em torno de 50 °C para os sistemas de PCR.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APP, A. A.; WATANABE, I.; ALEXANDER, M.; VENTURA, W.; DAEZ, C.; SANTIAGO, T.; DEDATTA, S. K. Non-symbiotic nitrogen-fixation associated with the rice plant in flooded soils. *Soil Sci.*, Philadelphia, v. 130, n. 5, p. 283-289, 1980.

BALDANI, J. I.; OLIVEIRA, A. L. M.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS Jr., F. B.; SILVA, L. G.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation (BNF) in non-leguminous plants: the role of endophytic diazotrophs. In: NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY, 12th, 1999, Foz do Iguaçu. Proceedings of the International Congress on Nitrogen Fixation. Dordrecht: Klumer Academic Publishers, 2000. p. 397-400.

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.*, Bethesda, v. 29, n. 5/ 6, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.

BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e, ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Itaguaí, 1996. 238 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen., nov. sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v. 36, p. 86-93, 1986.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY, 12th, 1999, Foz do Iguaçu. Proceedings of the International Congress on Nitrogen Fixation. Dordrecht: Klummer Academic Publishers, 2000. p. 409-410.

BÖTTGER, E. C. Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 65, p. 171-176, 1989.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, 2001.

DE SMEDT, J.; BAUWENS, M.; TYTGAT, R.; DE LEY, J. Intra- and intergeneric similarities of ribosomal ribonucleic acid cistrons of free-living, nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, v. 30, p. 106-122, 1980.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS - THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. Programme and Abstracts. Viçosa: JARD Produções Gráficas Ltda. 1995. p. 3.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa: Embrapa – SPI, 1995.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N₂ fixing bacteria. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science, v. 44, n. 5, p. 310-313, 1992.

DÖBEREINER, J.; REIS, V. M.; LAZARINI, A. C. New N₂-fixing bacteria in association with cereals and sugar-cane. In: NITROGEN FIXATION: HUNDRED YEARS AFTER, Stuttgart. Proceeding. Gustav Fischer, 1988 p. 717-722.

FOX, G.E.; STACKEBRANDT, E.; HESPELL, R.B.; GIBSON, J.; MANILOFF, J.; DYER, T.A.; WOLFE, R.S.; BALCH, W.E.; TANNER, R.S.; MAGRUN, L.J.; ZABLEN, L.B.; BLAKEMORE, R.; GUPTA, R.; BONEN, L.; LEWIS, B.J.; STAHL, D.A.; LUEHRSEN, K.R.; CHEN, K.N.; WOESE, C.R. The phylogeny of prokaryotes. Science, Washington, v. 209, p. 457-463, 1980.

GÜRTLER, V.; MAYALL, B. C.; Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Reading, v. 51, p. 3 – 16, 2001.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. J. Microbiol., Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HARTMANN, A.; BALDANI, J. I.; KIRCHHOF, G.; ASSMUS, B.; HUTZLER, P.; SPRINGER, N.; LUDWING, W.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Taxonomic and ecologic studies of diazotrophic rhizosphere bacteria using phylogenetic probes. In: FENDRIK, I.; DEL GALLO, M.; VANDERLEYDEN, J.; ZAMAROCZY, M. DE (eds.). *Azospirillum* VI and related microorganisms. Berlin: Springer Verlag, 1995.

HILLS, D. M.; MORTIZ, C.; MABLE, B.; Molecular systematics. Second Edition. Sunderland, MA, U.S.A. Sinauer Associates, Inc. 1996.

JAMES, E. K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crops Res., Amsterdam, v. 65, p. 197-209, 2000.

KARLIN, S.; WINSTOCK, G.M.; BRENDDEL, V. Bacterial classifications derived from recA protein sequence comparisons. J. Bacteriol., Washington, v. 177, n. 23, p. 6881-6893, 1995.

KENNEDY, C. Recent progress in characterization of associative and endophytic diazotrophs and their influence on host plant growth. In: NITROGEN FIXATION: FROM MOLECULES TO CROP PRODUCTIVITY, 12th, 1999, Foz do Iguaçu. Proceedings. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 395-396.

KIRCHHOF, G.; SCHLOTER, M.; ASSMUS, B.; HARTMANN, A. Molecular microbial ecology approaches applied to diazotrophs associated with non-legumes. Soil Biol. Biochem., Bethesda, v. 29, n. 5/ 6, p. 853-862, 1997.

- KLOEPPER, J. W.; BEAUCHAMP, C. J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 38, p. 1219-1232, 1992.
- LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, v. 82, p. 6955-6959, 1985.
- LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. *ASM News*, Washington, v. 65, n. 11, p. 752-757, 1999.
- MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 37, p. 549-553, 1991.
- MEDLIN, L.; ELWOOD, H. J.; STICKEL, S.; SOGIN, M. L. The characterisation of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, Amsterdam, v. 71, p. 491-499, 1988.
- OLIVE, G.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R.; Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Ann. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, v. 40, p. 337-365, 1986.
- SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, Washington, v. 239, p. 487-491, 1988.
- SUBBA RAO, N. S. Nitrogen-fixing bacteria associated with plantation and orchard plants. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 29, p. 863-866, 1983.
- TAPIA-HERNANDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M. R.; JIMENEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMIREZ, L. E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecol.*, New York, v. 39, n. 1, p. 49-55, 2000.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen-fixation to sugar-cane-N-15 and nitrogen-balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, v. 56, n. 1, p. 105-114, 1992.
- WEBER, O. B. Ocorrência e caracterização de bactérias diazotróficas em bananeiras (*Musa* spp.) e abacaxizeiros (*Ananas comosus* (L.) MERRIL) e seus efeitos no crescimento de mudas micropropagadas. Rio de Janeiro, 1998. 192 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- WILSON, A. C.; CARLSON, S. S.; WHITE, T. J. Biochemical evolution. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v. 46, p. 573-639, 1977.

8 APÊNDICE

8.1 OPERON RRNA DE HERBASPIRILLUM SEROPEDICAE

Contig 5 de *Herbaspirillum seropedicae* contendo o operon rRNA

1 TACCTACATAATCTCGTTCTCTGCTGCTGACGAACAAACGATCGCAGCGATGCAAACAGCGCCAAGCGGTTTGCGGCAG 80
81 ACAAGATCTTTAAAAATTAACAGCCGATAAGCGTGGGCGTTTAAATGAAGTGCGACAGAACTTCGGTTCTGGAACTTTAA 160
161 ATATTAATGCTCACAAGAAATATAGGTAAGTTCGCAAGAAATTACCTGTCAGTATTTTGAGAGAGCGATGCCCTTCGGG 240
241 GTAGCCAGAAATGGCACAAAACAGAGATTAAACTAAAGAGTTTGATCCTGGCTCAGATGAACTGGCGGCATGCCTTA 320
16S rDNA
321 CACATGCAAGTCGAACGGCAGCATAGGAGCTTGCTCCTGATGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGC 400
401 CCTAGAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTAGCTAATACCGCATACGATCTACGGATGAAAGTGGGGGATCGCAAGACC 480
481 TCATGCTCCTGGAGCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAAGCCTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTC 560
561 TGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAAT 640
641 GGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTGAGGGAAGAAACG 720
721 GTTTTGGCTAATATCCAGAACTAATGACGGTACCTGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA 800
801 CGTAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTGTGTAAGACAGATGTGAAATCCCCG 880
881 GGCTCAACCTGGGAATTGCATTTGTGACTGCACGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGGGGTAGAATTCACGTGTAGCAGTGAA 960
961 ATGCGTAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTGGGATAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGG 1040
1041 GAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCTACTAGTTGTGCGGCTCTAATTGACTTGGTAA 1120
1121 CGCAGCTAACGCGTGAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC 1200
1201 AAGCGGTGGATGATGTGGATTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTCGGAATCCTGAAGAGA 1280
1281 TTTGGGAGTGCTCGAAAGAGAACCGGCGCACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAG 1360
1361 TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTATTAGTTGCTACGAAAGGCACTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA 1440
1441 GGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTACATACAGAGGGCCGCC 1520
1521 AACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCAGAAAGTGATCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTTGGAA 1600
1601 TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGCTTGTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGC 1680
1681 GGGTTTTACCAGAAGTGGGTAGCCTAACCGTAAGGAGGGCGCTCACCACGGTAGGATTCTGTGACTGGGGTGAAGTCGTAA 1760
1761 CAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGGCGCTCGATCAGCTCTTCTAGAGTGCGCACGAAGTTAAGCGTCCACACTTATCGG 1840
pHR
1841 CTGTAATTCAAAGAACAGTTATTTGGTGAAGCGCGGTCTGTGGCAAACGTCAGTACTGGCTACTGATACTGATCCAAGC 1920
1921 GGGTCTGTAGCTCAGCTGGTTAGAGCACCGTGTGATAACGCGGGGGTTCGTTGGTTTCGAGCCCAACCAGACCCACCAAGG 2000
2001 TTTTCGGGGGTTTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTTCGTCGGTTTCGATCCCGTCAACCTCCACCA 2080
2081 AGAAATGTCAAACCTAAGTCAGCGTTCAAGTTGGCGTAGTGATTTAGGTTTGATCTTTTACGATCAATGGCTGTTTTTGT 2160
2161 TCTTTAACATCTGGAAGAAGTAAAGATTCAATTTAACGATCGCCAGGACTTCGGTTCTTGCGAAAGTAAAAATGGGTGT 2240
2241 GATTGTATCAATCAAAGTATTACGAAGTGATCTTAGCAATTAGAAGACTTACTTTGGAATACGGCAAACGCTAAAACTCA

2320

23S rDNA

2321 ACGCTTCTTTATAACGCTCTTGCAAAAGAGGCTAACGTTATAGGAACAAGCGAATAAGTGCGCATGGTGGATGCCTTGGC 2400
 2401 GATTACAGGCGATGAAGGACGTAGTAGCTTGCGATAAGCTGCGGGGAGCTGGCAAACAAGCTTTGATCCGCAGATTTCCG 2480
 2481 AATGGGGAAACCCGGGCCGTAAGGTCATCGTTATCTGAATACATAGGGTAACGAAGCGAACGTGGCGAACTGAAACATCTA 2560
 23S130f
 2561 AGTAGCTACAGGAAAAGAAATCAACCGAGATTCCTCAAAGTAGTGCGAGCGAAATGGGATCAGCCTGCAAGATTAGCAT 2640
 23S216r
 2641 CAACGATAGCAAAACGGAATGGAAAGTCCGGCCATAGTGGGTGATAGCCCCGTATGCGAAATCGATGGTGTGGAAGT 2720
 2721 CTTGCGACAAGTAGGGCGGGACACGTGAAATCCTGTCTGAACATGGGGGGACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCGTAATC 2800
 2801 GACCGATAGTGAACCACTACCGTGACGGAAAGGGGAAAGAACCCCGAAGGGGAGTGAAATAGATCTGAAACCGTGTG 2880
 BLF463/20 p23
 2881 CATACAAACAGTAGGAGCCTCGAAAGGGGTGACTGCGTACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTACATTCAGTGGCAAG 2960
 2961 CTTAACCGAATAGGGAAGGCGCAGAGAAATCGAGTCCGAATAGGGCGTTCAGTCGCTGGGTGTAGACCCGAAACCAAGT 3040
 3041 ATCTATCCATGGCCAGGTGAAGGTGCGGTAAACGCACTGGAGGACCGAACCCACTAATGTTGAAAAATTAGGGGATGA 3120
 23S708r
 3121 GCTGTGGATAGGGGTGAAAGGCTAAACAAATCTGGAAATAGCTGGTTCCTCCGAAAACATTTAGGTAGTGCCTCAAGT 3200
 3201 ATCACCATCGGGGGTAGAGCACTGTTATGGCTAGGGGGTCATCGCGACTTACCAAACCATGCAAACCTCGAATACCGAT 3280
 3281 GAGTGCGAGCTTGGGAGACAGACGCCGGGTGCTAACGTCGACGTCAAGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTC 3360
 3361 CCAAAGATTGGCTAAGTGGAACGAAAGTGGGAAGGCTAAAACAGTCAGGAGGTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAA 3440
 23S1075f
 3441 GAAAGCGTAATAGCTCACTGATCGAGTCGTCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCTAAGCCAGTCACCGAAGCTGCGGATA 3520
 3521 TCCGTAAGGATATGGTAGGAGAGCGTTCTGTAAGCCTGTGAAGGTGTCTGTAAAGGATGCTGGAGGTATCAGAAGTGCG 3600
 3601 AATGCTGACATGAGTAGCGATAATGCGGGTGAAAAGCCCGCACGCCGTAGCCCAAGGTTTCTGTTCACGTTTCATCGG 3680
 23S1315r
 3681 AGCAGGGTGAGTCGGCCCTAAGGCGAGGCAGAGATGCGTAGCTGATGGGAAGCAGGTTAATATTCCTGCACCGTCGTTA 3760
 3761 GATGCGATGGGGGGACGGATCGCGGAAGGTGTCCGGGTGTTGGAAGTCCCGGTTTTTGCATCGAAGAAGGCTGTTAGGC 3840
 3841 AAATCCGCGACGTAATCAAGGTGTGAGACGAGCGAACTTGTTGCGGAAGCAATCGGAAGTGGTTCGAAGAAAAGCCT 3920
 3921 CTAAGCTTCAGTCTAACGAGACCGTACCGCAAACCGACACAGGTGGGCGAGATGAGTATCTAAGGCGCTTGAGAGA 4000
 23S1623f
 4001 CGGGAGAAGGAACTCGGCAAATTGGTACCGTAACCTCGGGATAAGGTACGCCCAAGTAGTTTGACTGGCCTGCGCCAGAA 4080
 BLR1686/20
 4081 GGACAAAAGGGTTGCAATAAAATGGTGGCTGCGACTGTTTAATAAAAACACAGCACTCTGCAAACACGAAAGTGGACGTA 4160
 4161 TAGGGTGTGACGCTGCCCGGTGCTGGAAGATTAAATGATGGGGTGCAAGCTCTTGATTGAAGTCCAGTAACGGCGGC 4240
 4241 CGTAACATAACGGTCCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTGCGGTAAAGTTCGACCTGCACGAATGGCGTAACGATGGCCAC 4320
 4321 ACTGTCTCCTCCCGAGACTCAGCGAAGTTGAAATGTTTGTGATGATGCAATCTACCCGCGCTAGACGGAAGACCCCAT 4400
 23S2067f
 4401 GAACCTTTACTGTAGCTTTGCATTGGACTTTGAACCAATCTGTGTAGGATAGGTGGGAGGCTTTGAAGCAGGAACGCTAG 4480
 4481 TTTCTGTGGAGCCGACCTTGAAATACCACCTGGTTTGTGAGGTCTAACCTTGGTCCGTATCCGGATCGGGGACAG 4560
 4561 TGCATGGTAGGCAGTTTGACTGGGGCGGTCTCCTCCCAAAGTGTAACGGAGGAGTTCGAAGGTACGCTAGGTACGGTCGG 4640
 23S2253r

8.2 ALINHAMENTO PARA OS CONSENSOS DO 23S rRNA DAS SUBDIVISÕES DAS PROTEOBACTÉRIAS.

Seqüências consensos para as subdivisões alfa, beta, gama, delta e epsilon das Proteobactérias foram gerados a partir de alinhamentos entre seqüências de 23S rRNA de espécies pertencentes a cada subdivisão, disponíveis em: *The European Ribosomal RNA Database* (<http://oberon.fvms.ugent.be:8080/rRNA/>). As bases representadas em cada posição do consenso possuem, no mínimo, 70% de ocorrência entre as bases do alinhamento na mesma posição (não mostrado). O caracter “?” indica uma variação maior do que 30% entre as bases do alinhamento naquela posição.

Consenso para a Subdivisão Epsilon das Proteobactérias (alinhamento de 12 seqüências)

Consenso para a Subdivisão Gama das Proteobactérias (alinhamento de 74 seqüências)

Consenso para a Subdivisão Delta das Proteobactérias (alinhamento de 2 seqüências)

Consenso para a Subdivisão Beta das Proteobactérias (alinhamento de 23 seqüências)

Consenso para a Subdivisão Alfa das Proteobactérias (alinhamento de 40 seqüências)

Contig5 de *Herbaspirillum seropedicae* - região do 23S rDNA

```

1  ----- 1
1  ----- 1
1  ----- 1
1  ----- 1
1  ----- 1
1  ----- 1
1  GAAGTGATCTTAGCAATTAGAAGACTTACTTTGGAATACGGCAAACGCTAAACTCAACGCTTCTTTATAACGCTCTTGC 80

1  ----- 60
1  -----GGTTAAG?GACTAAGCGTACACGGTGGATGCC?TGGCAGTCAGAGGCGATGAAGGACGTG 60
1  -----????????TAAG?TA??AAG?GC????GGTGGATGCCT?GG??CCAAGAGGCGA?GAAGGACG?G 67
1  -----G?TCAAGCGA?TAAGTGCAT??GGTGGATGCCTTGGCGAT?ACAGGCGA?GAAGGACGT? 60
1  -----?A??A??????TAAG?GC?TT?GGTGGATGCCTTGGCA????GAGGCGATGAAGGACGTG 61
81  AAAAGAGGCTAACGTTATAGGAACAAGCGAATAAGTGCATGGTGGATGCCTTGGCGATTACAGGCGATGAAGGACGTA 160

61  CTAG?CTGCGATAAGCT??G?GGAG?TG?CAAG???-CTTTGAT?CG?AGATTCCGAATGGGGCAACCCAAT??ATAGA 139
61  CTAA?CTGCGA?AAGCG?CGGT?AG??G?TA?GA??CGTT??A?CCGGCGAT?TCCGAATGGGGAAACCCA?T????T? 140
68  G?T??CTGCGAAAAGCT?CGGGGA??TG??AA?CGA??GT?GA?CCG?AGATGTCCGAATGGGGAAACCC?GC??G?? 147
61  G?AGCCTGCGAAAAGCT?CGGGGAGCTGGCAA?C?AGC?TTGATCCG?AGATGTCCGAATGGGGAAACCC???????? 140
62  ?TACGCTGCGATAAGC??GGGGAG?TGCAGAA?AA?-CTTTGATCCG??GATTTCGAATGGGGAAACCCACCT???? 140
161  GTAGCTTGCAGATAAGCTGCGGGGAGCTGGCAAACAAGCTTTGATCCGCAAGATTTCGAATGGGGAAACCCGCGCTAAGG 240
                                     GATTTCGAATGGGGAAACCC
                                     23S130f

140  GATAT?-----?ATTACC??AT?GGA---GCGAAC??G?GAA?TGAAACATCT?AGTA?C??AGGA 201
141  ??????TAT---C?T?AACTGAAT?CATAG?TT?A?G-AGGCGAACCGGGGAACTGAAACATCTAAGTACCCCGAGGA 216
148  ???G??GT?A?CC??CTGAATACATAGG????G?AGCGAAC??GGGAA?TGAAACATCT?AGTACC??AGGA 227
141  ??????AT----CC??CTGAATACATAGG????GA?GCGAAC??GTGAACCTGAAACATCTAAGTA?C??AGGA 215
141  ???????-????????????????????????????????GGTA?T?????TGAATACATAG??T 213
241  TCATCG-----TTATCTGAATACATAGGTAACG-AAGCGAACGTGGCGAACTGAAACATCTAAGTAGCTACAGGA 310
                                     ACATCTAAGTACCCCGAGGA
                                     23S216r

202  AAAGAAATCAA-??GAGATT?CGT?AGTAGCGGCG-AGCGAA?GCG?AA?AGGGCAAACC?AGTGCTTGCA?T?GGGGTT 279
217  AAAGAAATCAA-CCGAGATTCCC??AGTAGCGGCG-AGCGAACGGGGA??AG-----CCC??A?----- 273

```


228 ?AAGAAA?CAAT??G?GA?TCC??TAGTAG?GGCG-AGCGAA??GGA??AGCC?AAACC???????????????? 306

216 AAAGAAATCAA-CCGAGATTCC??AAGTAGTGGCG-AGCGAAA??GGA??AG-----CCT?T??----- 272

214 ?T?GA?GC?AA-CCC?G?GAACTGAAA?ATCTAAGTA?C?GGAGGAAAGGACATCAACCGAGACTCCG?TAGTAGTG?CG 292

311 AAAGAAATCAA-CCGAGATTCCCAAAGTAGTGGCG-AGCGAAATGGGATCAG-----CCTGCAA----- 367

280 G?AGGACTGCAA??-----T?CAAGAG?????TTTAGCAGAA??TCTGGAAAG??AGCCATAGAGGGTGATAG?CC 352

273 -----????-----?????????GT?TAG??GAA??TCTGGAAAG??GC?ATA?AGGGTGA?AGCCC 336

307 GGGGTTG?GGG??C?CG??A-?G????C??AGAGCTAGC?GAA??C?TGG?AAGG????CCA?AGA??GTGATAG?C? 385

272 -----?T?-----T????--?T????TAG??GAAC????TGGAAAG??GGCCATAG??GGTGATAGCCC 333

293 AGCGAACCGCGGA?CAGGCCAGTG??????????A?AA??A?AA??TGGAAAG????CCATAG?GGGTGATAG?CC 372

367 -----GATT-----TAGC---ATCAACGATAGCAAAACGGAATGGAAAGTCCGGCCATAGTGGGTGATAGCCC 427

353 ?GTATGCGAAAA?????CTTAG?TAGCAGTATCC?GA---GTAGG?C?GGACACGAG?AATCC?G?CTGAA?C?GGG?? 429

337 CGTA?C?AAA??C?????????????GAG-----TAGGGCGGGACACGTG?TATCCTGTCTGAATATGGGGG 410

386 ?GTA?GCGAAAG?T????G?CC?AG?G?G?T?CCC?A---GTA?GGCGGGACACG?G?AA?CCTG?C?GAA?CTG??G 463

334 ?GTA?CGAAAA????A?G?G?A?A?G?T????AAGTAGGGCGGGACACGTGAAATCCTGTCTGAA?ATGGGGG 413

373 CGTA??G---TA?????????T?CT?GAG-----TA?GGCGGGACACGTGAAATCCTGTCTGAACATGGGG 442

428 CGTATGCGAAATCGATGGTGTGGAAGTAGGCTTGCACAA-GTAGGGCGGGACACGTGAAATCCTGTCTGAACATGGGG 506

430 GACCAC??TCCAACCCCTAAATACTA?TAC?AGA?CGATAG?G?ACAAGTACCGTGAGGGAAAGGTGAAAAGAAGTGA?GT 509

411 GACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCCTGACTGACCGTAGTGAACCACTACCGTGAGGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGG? 490

464 GACCATC????AAGGCTAA?TACT?CTTGG?GACCGATAG?G?AC?AGTACCG?GAGGGAAAGGTGAAAAGAAGCCCG?G? 543

414 GACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCGT?ATCGACCGATAGTGAACCACTACCGTGAGGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGG 493

443 GACCACCCCTC?AAGCCTAAGTACTC????TGACCGATAGTGAAC?AGTACCGTGAGGGAAAGGTGAAAAG?ACCCCGAC 522

507 GACCATCCTCCAAGGCTAAATACTCGTAATCGACCGATAGTGAACCACTACCGTGAGGGAAAGGCGAAAAGAACCCCGGA 586

CCGATAGTGAACCACTACCG

BLF463/20

510 GATCAGAGTGAATAGAACCTGAAACCAT?TGCTTACAATCATTCAGAGC?CTATG?A??AT?--CAG?-GTGATGGAC 586

491 GAGGGGAGTGAAG?AGAACCCTGAAACCGTGTACGTACAAGCAGTGGGAGC??T??GT-----GTGACTGCG 561

544 GAGGGGAGT??AA-AGAA?CTGAAACC??TGT?TACAAGCAGT??GAG?GC?A?G?C?GCAA?G??A?GC?CGA??GCG 622

493 -AGGGGAGTGAATAGATCCTGAAACCG?ATGCATACAAACAGTCCGAGCC?????GGG-----TGACGGCG 562

523 ?AGGGGAGTGAAG?AGTA?CTGAAACC??ATGC?TACAAGCAGTCCGAGC?????TT????--????GTGACGGCG 600

586 -AGGGGAGTGAATAGATCCTGAAACCGTGTGCATACAAACAGTAGGAGCCTCGAAAGGGG-----TGACTGCG 654

587 TGCCTTTGTGATAATGA?CCTGCGAGTTGTGGT?TCTGGCAAGGTTAAGC?AAC--GCGAAGCCGTAGCGAAAGCGAGTC 664

562 TACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTATATTCTGTAGCAAGGTTAACCG?ATA-GGGGAGCCG?AGGGAAACCGAGTC 640

623 TACCTTTTGCATCATGA?C??CGA?TT??GT??G?GC?AGG?TAAGCCGAT?GG?G?AGCCG?AGCGAAAGC?AGTC 702

563 TACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTACATTAGT?GC?AGCTTAACCGA?TA-GGG?AGGCGTAG?GAAA?CGAGTC 641

601 TACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTA?T?TA?C?AGCAAGCTTAAGCCG?TAGGTGTAGGCG?AGCGAAAGCGAGTC 680

655 TACCTTTTGTATAATGGGTCAGCGACTTACATTAGTGGCAAGCTTAACCGAATA-GGGAAGGCGCAGAGAAATCGAGTC 733

665 T?AATAGGGCG??T?AGTCAGATGCTGCAGA-CCCGAA?C?AAGTGATCTATCCATG??CAAGTTGAA?CT?GTGTAA?A 743

641 TTAA?TGGGCGT?-?AGTTGC?GGGTATAGA-CCCGAAACC?GGTGATCTAGCCATGGGCAGGTTGAAGGTTGGGTAACA 718

703 ?GA?A?GGGCG????AGT?GC??GT??A?ACCCGAA?C??GTGATCTA??CATG??CAGG?TGAAG?GCGGGTAA?A 782

642 CGAATAGGGCGTT-CAGT?GCTGGGTGTAGA-CCCGAAACC??GTGATCTATCCATGGCCAGGTTGAAGG??CGGTAACA 719

681 TGAATAGGGCGT?-?AGTT?G?TG?ATTAGA-CCCGAAACC??GTGATCTAGCCATG??CAGG?TGAAG?G????GTAA?A 758

734 CGAATAGGGCGTT-CAGTCGCTGGGTGTAGA-CCCGAAACCAGATGATCTATCCATGGCCAGGTTGAAGGTGCGGTAACA 811

AGCCATGGGCAGGTTGAAGG

23S708r

744 ?C?AGTGGAGGACTGAAC?C?TA??C?TTGAAA?G??C?GGGATGA??TGTGGATAGGGGTGAAAGGCCAATCAAACCT? 823

719 CTAAGTGGAGGACCGAACCAGCTAATGTTGAAAAATTAGCGGATGACTTGTGGCT?GGGGTGAAGGCCAATCAAAC??G 798

783 C?GC?TGGAGG?CCGAACTCA??A?AGTTGAAAAT?T??GGGATGA??TGTG??TAGG?GTGAAAGGC?AATCAAAC?? 862

720 CGT?CTGGAGGACCGAACCCTA?A?GTTG?AAA?T?AGGGGATGAGCTGTGGATAGGGGTGAAAGGCTAAACAAAC??G 799

759 ???ACTG?AGG?CCGAACC?A??CTGTTGAAAAG???GGATGA??TGTGG?TAGGGGTGAAAGGCCAATCAAAC??G 838

812 CGCACTGGAGGACCGAACCCTAATGTTGAAAAATTAGGGGATGAGCTGTGGATAGGGGTGAAAGGCTAAACAAATCTG 891

824 GTGATAGCTGGTTCTCT?CGAAATATATTTAGGTATAGC?T??GT??TA-ATA?AAGGGGGTAGAGC?CTGA?TGGGCT 902

799 GAGATAGCTGGTTCTCCCCGAAAGCTATTTAGGTAGCGCCTCG?G??C-A????GGGGGTAGAGCACTGTTTCGGC? 877

863 G?GATAGCTGGTTCTC?CCGAAA?ATATT?AGGTAT?G?TCAG??AT??G?A?CGG?GGTAGAGCACTGGA?GCGCT 942

800 GA?ATAGCTGGTTCTC?CCGAAAATTTAGGTAGTGCCTCG?GT?TC--AC????GGGGGTAGAGCACTGT?ATGG?T 877

839 GA?ATAGCTGGTTCTCCGCGAAA?CTATTTAGGTAG?GC?T?????TACC??G??GGTAGAGCACTG?ATG?GCT 918

892 GAAATAGCTGGTTCTCTCCGAAAATTTAGGTAGTGCCTCAAGTATC--ACCATCGGGGTAGAGCACTGTTATGGCT 969

903 AGGGC????CACC??GTACCAAACCTATCAAAC?CGAATACCTT?TA-T??ATC??G?AGTCAGGCGG?G?G-TG 980

878 AGGGGG?CATCCCG?CTTACCAACCCGATGCAAACT?CGAATACC??A?TG??A?C?CGGGAGACACACGGCGGG-TG 956

943 AGGG-G??CAC?A??TTACC?AACC?ACCAAACCTCCGAAT?CCG?T?AC??A??CTGG?A??CAG?CAGTG?G-?G 1020

878 ?GGGGGT?AT?GC?A?TTACC??CCAT?GCAAACTCCGAATACC??A?AGT?A?C?CGGGAGACAGAC??C?GGGTG 957

919 AGGGGG?C?CAC?G?CTTACCAAACT?AA?CAAACTCCGAAT?C??GAGTAC????G?-AGACA?AC??GGG-TG 996

970 AGGGGGTCATCGCACTTACCAAAACCTTGCAAACTCCGAATACCGATGAGTGCGAGCTTGGGAGACAGACGCCGGG-TG

1048

981 ATAAAAATC??TCGTCAA?AGGG?AACCAACCCAGACTACCA??TAAGGTCCCTAA?TC?TACTT?AGTGGAAAA?GAT--- 1057
957 CTAACGTCCGTCTGT?AGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCCAAAGTCAT?GTTAAGTGGGAAACGAT--- 1033
1021 ?TAA??T?CATTG?C?AGAGGG?AA?AACCCAGACCG?CAGCTAAGG?CCCCAA?TC??CTAAGTG????????AAG 1100
958 CTAACGTCCGG??TCAAGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCC?AA??A?T?GCTAAGTGGGAAACGAA--- 1034
997 CTAAG?GTCC?T?GT?GAGAGGGAAA?A?CCC?GACC??CA?CTAAGG?CCC?AA?TC?TG?CTAAGTG??AAAGGAT--- 1073
1049 CTAACGTCCGACGTCAAGAGGGAAACAACCCAGACCGCCAGCTAAGGTCCCAAAGA-TTGGCTAAGTGGAAACGAA--- 1124

1057 ---GTG?AGTTACT?AAACAACCAAGGAGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAAAGCGTAA?AGCTCACTGGTC- 1133
1033 ---GTGGGAAGGC??AGACAGC?AGGATGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCATTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACT?GTC- 1109
1101 GATGTGG?AG??C??GACA?CCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAAAGCGTAA?AGCTCACTGGTC- 1179
1034 ---GTGGGAAGGC??A?ACAGTCAGGA?GTTGGCTTAGAAGCAGCCA?CCTTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGATC- 1110
1073 ---GTG?G?A??CCAAAACAAC?AGGA?GTTGGCTTAGAAGCAGCCATC?TTTAAAGAAAGCGTAA?AGCTCACT?GTCT 1150
1124 ---GTGGGAAGGCTAAAAACAGTCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAAAGCGTAATAGCTCACTGATC- 1200

GGATGTTGGCTTAGAAGCAGC
23S1075f

1133 ----TAGTGATT?TGCGC?GAAAATATAACGGGGCT-AA?GTA?G?ACCGAA??TGTAAG----?T????T?--????? 1202
1109 ----GAGTCGGCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCT-AAAC?ATGCACCGAAGCTGCGGC---A???????T????? 1180
1179 ----?AG??A??C?GCGCCGAAAAT??AACGGG?CT?AAG??G??CCGAAGCT?CGGGTC??C?????A?????G? 1255
1110 ----GAGTCGTCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCT-AAGC?A??ACCGAAGCTGCGG----ATG?????T?????G 1180
1151 AAATAAG??T??TGCGCC?A??ATGTAACGGGGCTCAAG?CA?G??CCGAAG?T?TG----?T?????T????? 1225
1200 ----GAGTCGTCTGCGCGGAAGATGTAACGGGGCT-AAGCCAGTCACCGAAGCTGCGG----ATATCCG---TAAGGA 1267

1203 AGT--GGTAG?AGAGCGTTCTA?T??GCGT?GAAGGTATACCGGTAAAGAGTGCTGGAGCG??TAGAAGTGAGCATGCAG 1280
1181 T?TTGGGTAGGGGAGCGTTCTGTAAGCC??GAAGGTG??G-G?GAGG??TGCTGGAGGTATCAGAAGTGCGAATGCTG 1259
1256 ??GGCGGTAGG?GAG??T?????G-CGG?GAA?G??AC?G-AAA?G??G?TGAG?G?????AG?GCTGATG??G 1333
1181 CAT--GGTAGG?GAGCGTTC?GTAAGCCTG?GAAGGTG??TTG-TAAAG??TGCTGGAGGTATC?GAAGTGCGAATG?TG 1257
1226 ?????GGTAGCGGAGCGTTCGTAAGCCTG?GAAGG? ?????GT?AG????CTGGAGGTATCGGAAGTG?GAATGCTG 1305
1268 TAT--GGTAGGAGAGCGTTCTGTAAGCCTGTGAAGGTGCTTG-TAAAGGTATGCTGGAGGTATCAGAAGTGCGAATGCTG 1344

1281 G?ATGAGTAGCGATAA??ATGTGAGAATC?T??CGCCGTAA?CCAAGGTTTCCTACGCGATGCTCGTCATCGTAGGG 1360
1260 ACAT?AGTAACGATAAAG?GGGTGAAAA?CCC?CTCGCCGAAGACCAAGGTTTCCTGTCCAACGTTAATCGGGGAGGG 1339
1334 ??ATGAGTAGCGATAA??GGGTGA?AAACCC?TCGCCGTAAACCC?AGG?TTCCTGGGT?AAG?T?ATCTTC?CAGGG 1413
1258 ACATGAGTAGCGATAAAGGGGGGTGAAA?GCCCCCTCGCCGTAA?CCAAGGTTTCCT?CGCAACGTTTCATCGGCGTAGGG 1337
1306 ACAT?AGTAGCGA?AAA?A??GTGAGA?AC??T?TCGCCGAAGTCCAAGGTTTC?TGCGTAAAGTTAATCTGCGCA?GG 1385
1345 ACATGAGTAGCGATAATGCGGGTGAAGGCCGCA?CGCCGTAAAGCCCAAGGTTTCCTGTTCAACGTTTCATCGGAGCAGGG 1424

GCCGGAAGACCAAGGTTTC
23S1315r

1361 TTAGTCGGGTCCTAAGTCGAGTCCGAAAGGGGTAGACGATGGCAAATTGGTTAATATTTCCAATACC?AC??T?GTG?GCG 1440
1340 TGAGTCGACCCCTAAGGCGAGGC?GAAA?GCGTAGTCGATGGGAAAC?GGTTAATATTTCC?GTACTT????TTA-TGCG 1418
1414 TTAG?CGG??CCTAAG??GAGGC?GAAA?GCGTAG??GATGG?AAGCAGG??AA?ATTCTGTC?CCA?C?G?A????? 1493
1338 TGAGTCGGCCCCCTAAGGCGAGGCAGA?ATGCGTAGCTGATGGGAA?CAGGTTAATATTTCTG?ACC????T??-TGCG 1416
1386 T?AG?CGGCCCCCTAAG??GAGGC?GAAAGGCGTAGTCGATGGGAA?CAGGTTAATATTTCTG??CC?G??GG??----- 1459
1425 TGAGTCGGCCCCCTAAGGCGAGGCAGAGATGCGTAGCTGATGGGAAGCAGGTTAATATTTCTGACCGTCGTTAG-ATGCG 1503

1440 --ATGG??GGACGC?TAGGG?TAAG?G?GCTAGC??GATGGAAG--??GCTAGTCTAAGG?CGTAGG????A??A?GG 1516
1418 --A?GGGGGACGCGAGAAGGCTA?GT??GCC?G-GCGA?GGTTG--TC-C?GGTTTAAG??GTAGG?GG?????AGG 1492
1494 T????T?AGG??GGACGAG?AGG?TAG?CGAGC??TG?TG??T????GT?CAA??GTAGG?G?TCGCGTA?G 1573
1416 --ATG?GGGACGGA????G??AGGTT?TC??G-GTGTGGA?G--TC-C?GT????GC?????G????C?CTTAGG 1490
1459 -----GTGACG?A????--T-A??-----TT----GT????CTTAT?GGATTG?T?----- 1500
1503 --ATGGGGGACGGATCGCGGAAGGTTGTCCGG-GTGTGGAAG--TC-CCGGTTTTGTCATCGAAGAAGGCTG-TTAGG 1576

1516 -CAAATCC????T???????TCCGA?A?CT?A?AGGCT??TT??AGTC?TTC??GATGGATAG?AGAA?C?CTGAT?CCG 1595
1492 -?AAATCCGG???????AA?GCTGAG??GATGAC-GAG??ACTACGGT??TG-----AAG?A??-ATGCC? 1560
1574 A????A????????????GC????A?C?CCGAGA?--??ATG?G??C?CGCAA?G?GG??A?TCG?TGA?CCA 1650
1490 -CAAATCC??G????????T????G????G??C-GA?CG?????????C?C-----GAAG?AA?T--G????? 1560
1500 -----?GAC-?????A????TCCAG-----GAAAT----- 1525
1576 -CAAATCC---GCGAGCGTAATTCAAGGGTGTGAGAC-GAGCGAAGTTGTTTCGCG-----AAGCAAT---CGGAAG 1639

1596 TCG?GCCAAGAAAAGT?TCTAAGTTT--AGC?A??GT?G--CCCGTAACCGTAAACCGACACAGGTGG?T??G??GAGTA 1671
1561 TGCTTCCAGGAAAAGCCTCTAAGC?TCAGGTAA????A--ATCGTACCCCAAACCGACACAGGTGGT?CAGGTAG-AGAA 1637
1651 ?GCTTCCAAGAAAAG??C?????G?G??C??T??G?TG?CCGTACCG?AAACCGACACAGGTGGGTG?GGAG-AA?A 1729
1561 ?G?TTCGAAGAAAAGCC?CTAAGCTTCAG??A????G--ACCGTAACCGCAAACCGACACAGGTGGGC??G??GAGTA 1638
1525 -----A-----GC??T?????-----TAGACC-----GTACCC?AAACCGACACAGGTGGAC?GGTAG-AGTA 1580
1640 TGGTTCCAAGAAAAGCCTCTAAGCTTCAGTCTAACGAG--ACCGTAACCGCAAACCGACACAGGTGGGCGAGATG-AGTA 1715

CCCCNAACCGACACAGGTGG
23S1623f

1672 TTCTAAGGCGCGTG?AAGAACTCT??-TTAAG**GA**ACTCTG**CAAA**?TAGCACC**GT**A??TTCG??ATAAGGTGTG??-???? 1749

1638 TACCAAGGCGCTTGAGAGAACTCGGG-TGAAG**GA**ACTAGG**CAAAATGGT**?CCGTAAC**TT**CGGGAGAAGG?ACGCTG???? 1716

1730 TCC?AAGGCGCTTGAGAGAACTC??T??AAG**GA**ACT?GG**CAAAAT**??**CACCG**TAAC**TT**CGG?AGAAGGTG?GCC-??T? 1808

1639 TTCTAAGGCGCTTGAGAGAACTC?GG-AGAAG**GA**ACTCGG**CAAAATTG**?TACCGTAAC**TT**CGGGGA?AAGGTA?GCC-CT?? 1716

1581 TACCAAGGCGCTTGAGAGAACT?ATG?-TGAAG**GA**ACT?GG**CAAAAT**?C?**TC**?GTAAC**TT**CGG?AGAA?GA?G?CC??T?T 1659

1716 TTCTAAGGCGCTTGAGAGAACTCGGG-AGAAG**GA**ACTCGG**CAAAATGGTACC**TAAC**TT**CGGGATAAGGTACGCC-CAAG 1793

GAACTAGG**CAAAATGGTGCC**

BLR1686/20

1750 ??????????????A?????????????????T??CA?CAAAGAGTCCCTCCCGACTGTTTACCAAAAAACACAGCA 1829

1717 ???GGTGAA?????T??C??T?G?AGCTGA??CAGTCGAAGATACCAG?TGGCTGCAACTGTTTATTAACAAACACAGCA 1796

1809 G??GGTG??GCG?T??GCC??GCG??G?GGTTGCAGAGAA??GG?GGTAGCGACTGTTTACCAAAAAACACAGGA 1888

1717 ?A??T?A?G??T??AG??T??A?GGGGT?GCA??AA??GGTGGCTGCGACTGTTTA?AAAAACACAGCA 1796

1660 ?TGGGCAACCAT????GG?GGCACA??C?AGGGGGTAG-----CGACTGTTTA?AAAAACACAGGG 1722

1794 TAGTTTGA-CTGGCCTGCGCCAGAAGACAAAGGGT?GCAATAAAATGGTGGCTGCGACTGTTTAATAAAAACACAGCA 1872

1830 CT?TGC?AACTCGT-AAGAGGA?GTATA?GGTGTGACGCCCTGCCCGGTGCTCGAAGGTAA??G??G?GT?AGC??A 1908

1797 CT?TGCAAAACACGA-AAGTGGACGTATA?GGTGTGACGCCCTGCCCGGTGCCGGAAGGTAAATGATGGGGT?AGCG?AA- 1874

1889 CTCTGCGAAG?CG?CAAG?CGACGTATAGGGTCTGAC?CCTGCCCGGTGC?GGAAGGTAA??GGA??GTACAG?GCAA 1968

1797 CTCTGCAAAACACGA-AAGTGGACGTATAGGGTGTGACGCCCTGCCCGGTGCCGGAAG?TTAA?TGATGGGGTGC----- 1868

1723 CTCTGC?AAGTC??-?AGACGACGTATAGGGTCTGACGCCCTGCC??GTGC?GGAAG?TTAA?AGGAGG?GTGC----- 1794

1873 CTCTGCAAAACACGA-AAGTGGACGTATAGGGTGTGACGCCCTGCCCGGTGCTGGAAGATTAAATGATGGGGTGC----- 1944

1909 ?GCGAAGCT?T??AT?GAAGCCCGAGTAAACGGCGGCCGTAAC**TATAACGGT**CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGTT 1988

1874 -GCGAAGCTCTTGATCGAAGCCCGGTAAACGGCGGCCGTAAC**TATAACGGT**CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGT 1953

1969 ?GC?AAGC??GA??CGAAGCCCG?GTAAACGGCGGCCGTAAC**TATAACGGT**CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTG?CGGGT 2048

1868 ----AAGCTCTTGAT?GAAG?CCCGGTAAACGGCGGCCGTAAC**TATAACGGT**CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGT 1944

1794 ---AA?GCTCTGAATTGAAG?CCC?GT?AACGGCGGCCGTAAC**TATAACGGT**CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGT 1871

1944 ----AAGCTCTTGATTGAAGTCCAGTAAACGGCGGCCGTAAC**TATAACGGT**CCTAAGGTAGCGAAATTCCTTGTCGGGT 2020

1989 AAATACCGACCTGCATGAATGGCGTAACGAGATGGGAGCTGTCTCAA??AGGGAT?CAGTGAAATTGTAGTGGAGGTGAA 2068

1954 AAGTTCGGACCTGCACGAATGGCGTAATGATGGCCA?GCTGTCTCCACCCGAGACTCAGTGAAATTGAA?TCGCTGTGAA 2033

2049 AAGTTCGG?CCTGCACGAATGG?GTAACGACTTCC?C?CTGTCTCG??GAGACTCAGCGAAATTGAAAT?G?GTG?? 2128

1945 AAGTTCGGACCTGCACGAATGGCGTAACGATGGCCACACTGTCTCCTCC?GAGACTCAGCGAAGTTGAAGTG?TTGTGAT 2024

1872 AAGTTCGGACCTGCACGAATGGCGTAACGA?TTCCCC?CTGTCTCCA??AT?GACTCAGCGAAATTGAATTC?CCGTGAA 1951

2021 AAGTTCGGACCTGCACGAATGGCGTAACGATGGCCACACTGTCTCCTCCCGAGACTCAGCGAAGTTGAATGTTTGTGAT 2100

2069 AATTCCTCCTACCCCG**GGCAAGACGGAAAGACCCCG**TGGACCTTTACTACAGCTTG?CACTGCTA?T?GGA??A??ATG? 2148

2034 GATGCAGTGTACCCCG**GGC?AGACGGAAAGACCCCG**TGAACCTTTACTATAGCTTGACACTGAACATTGA?CCT??ATGT 2113

2129 GATGC??T?TACCCCG?**GCAAGACGGAAAGACCCCG**TGAACCTTTACT?CA?CTTG?CA?TG??T?GG??TG?CTGT 2208

2025 GATGCAATCT?CCCG**GGCTAGACGGAAAGACCCCG**TGAACCTTTACTGTAGCTTTGCATTGGACTTTGAAC?GA?CTGT 2104

1952 GATGCGG?GTTCCCG**GGT?AGACGGAAAGACCCCG**TG?ACCTTTACT?TAGCTTTGCACTGG?ATTAG?A??TGT 2031

2101 GATGCAATCTACCCCG**GGCTAGACGGAAAGACCCCG**TGAACCTTTACTGTAGCTTTGCATTGGACTTTGAACCAATCTGT 2180

GGCNAGACGG**AAAGACCCCG**

23S2067f

2149 GCAGGATAGGTGGGAGGCTTTGA????A?GAC?C?GTT?T??GAGCCAT?GTTGAGATACCAC?CTT?CTT?TT??G 2228

2114 GTAGGATAGGTGGGAGGCTTTGAAG??GACGCCAGT????TGGAGCC??CCTTGAATACCACCCTT??ATGTTTGA 2193

2209 GTAGGATAGGTGGGAG?CT?TGA?G??GGGCCGCTAGGTTC??GGAG?CAACG?TGAATACCACCCTG??A?T??T 2288

2105 GTAGGATAGGTGGGAGGCT??GAA?C?G?GACGC?AGTTTC?GTGGAGCC?TCCTTGAATACCACCCTGGT?TGTTTGA 2184

2032 G?AGGATAGGTGG?AG?CT??GAAGC??GGCG?CAGC??GTGGAG?CA??CTTGA?ATACCACCCT????TT?TTG 2111

2181 GTAGGATAGGTGGGAGGCTTTGAAGCAGGAACGCTAGTTTCTGTGGAGCCGACCTTGAATACCACCCTGGTTTGTTTGA 2260

2229 ?TAGCTAAC??GCTTGAGTTA-TCCTCAAG??GGACAATG?CT**GGTGGGTAGTTGACTGGGG**CGGTTCGCTCC?AAA?A 2307

2194 TGTTCTAAC?T?G?CCGT?A-TCCGGGT?G?GGACAGTGTCT**GGTGGGTAGTTGACTGGGG**CGGTCTCCTCC?AAAGA 2272

2289 ??G?CTAACCT?TG?CC??T?A-?C??GG??GGGACACTG?CT**GGTGGGTAGTTGACTGGGG**CGGTCTCCTCC?AAAGA 2367

2185 GGTTCCTAACCT?GG?CCG??ATCCGG?TCGGGGAC?GTGCAT**GGTAGGCAGTTTACTGGGG**CGGTCTCCTCCCAAAG? 2264

2112 AT?TCTAACCG?G??CC??A?C?GG?TCCG?GAC?TGCA**GGTGGGTAGTTTACTGGGG**CGGTTCGCTCCCAAAGA 2191

2261 GGTTCCTAACCTTGGTCCGTTA-TCCGGATCGGGGACAGTGCAT**GGTAGGCAGTTTACTGGGG**CGGTCTCCTCCCAAAGT 2339

GGTGGGTAGTTTACTGGGG

23S2253r

2308 ?TAACGGAGGCTT?CAAAGGTTGGCTCAGAACGGTTGGAAATCGTTCGT?G-AGT?TAA?GG?ATAAGCCAGC?T?ACTG 2386

2273 GTAACGGAGGAGCACGAAGGT??GCTAATC??GGTCGGACATC?GAGGTT-AGTGCAA?GGCATAAGC??GCTT?ACTG 2351

2368 GTAACGGAGGCGCGC?A?GGTTCCTCAG?C?GATTGGAAACC?G?CG??G-AGTG?AA?GGCATAAGGGAGCTTGACTG 2446

2265 GTAACGGAGGAGTTCGAAGGTACGCT?GGTACGCTCGGAAATCGT?C?A?-AGTGCAATGGCA?AAGCGTGCTT?ACTG 2343

2192 GTAACGGAGGCGCGCGATGGT??GCTCAG??GGTCGGAATC????T?GAGTGCAATGGCATAAGC??GCCTGACTG 2271

2340 GTAACGGAGGAGTTCGAAGGTACGCTAGGTACGCTCGGACATCGTGCTAAT-AGTGCAATGGCATAAGCGTGCTTAAGT 2418

2387 CAAGACATACAAGTCAAGCAGAGACGAAAGTCGGTC?TAGTGATCCGGTGGTTCTGTGTGGAAGGGCCATCGCTCAAAGG 2466

2352	CGAG??GAC?G??CGAGCAGGT?CGAAAG?AGGTC?TAGTGATCCGGTGGTTCTG?ATGGAAGGGCCATCGCTCAACGG	2431
2447	CGA??CA?ACA?G??GAGCAGG??CGAAAG??GG?C?TAGTGATCCGGTGGT?CTGAATGGAAGGGCCATCGCTCAACGG	2526
2344	CGAGAC?GACAAGT?CGAGCAGGTGCGAAAGCAGGACATAGTGATCCGGTGGTTCTG?ATGGAAGGGCCATCGCTCAACGG	2423
2272	CGAG?CTGACAAG?CGAGCAGAGACGAAAGTCGGTCATAGTGATCCGGTGGTCCCG?GTGGAAGGGCCATCGCTCAACGG	2351
2419	CGAGACTGACAAGT?CGAGCAGGTACGAAAGTAGGACATAGTGATCCGGTGGTTCTGTATGGAAGGGCCATCGCTCAACGG	2498
2467	ATAAAAGGTACCCCGGGGATAACAGGCTGATCTCCCCAAGAGCTCACATCGACGGGGAGGTTTGGCACCTCGATGTCGG	2546
2432	ATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGG	2511
2527	ATAAAAGGTACTCCGGGGATAACAGGCTTATC?C?CCCAAGAGTTCACATCGACGG?G?GGTTTGGCACCTCGATGTCGG	2606
2424	ATAAAAGGTACTCTGGGGATAACAGGCTGATACCGCCCAAGAGTTTCATATCGACGGCGGTGTTTGGCACCTCGATGTCGG	2503
2352	ATAAAAGGTAC?CCGGGGATAACAGGCTGATGA??C?AAG?GTCCATA?CGACG??T?GTTTGGCACCTCGATGTCGG	2431
2499	ATAAAAGGTACTCTGGGGATAACAGGCTGATTCTCCCAAGAGTTTCATATCGACGGGGAGTTTGGCACCTCGATGTCGG	2578
	GCACCTCGATGTCGG	
	23S2515f	
2547	CTCATCGCATCCTGGGGCTGGAGCAGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTTCGCCATTTAAAGCGGTACGCGAGCTGGGTTT	2626
2512	CTCATCACATCCTGGGGCTGAAGT?GGTCCCAAGGGTATGGCTGTTTCGCCATTTAAAGTGGTACGCGAGCTGGGTTT	2591
2607	CTCATCGCATCCTGGGGCTG?AG?AGGTCCCAAGGGTGGTGGCTGTTTCGCCAATTTAAAGCGGTACGCGAGCTGGGTTT	2686
2504	CTCATCTCATCCTGGGGCTGTAGCCGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTTCGCCATTTAAAGAGGTACGTGAGCTGGGTTT	2583
2432	CTCATCACATCCTGGGGCTGGAG?AGGTCCCAAGGGTGGTGGCTGTTTCGCC?ATTTAAAGTGGTACGTGAGCTGGGTTT	2511
2579	CTCATCACATCCTGGGGCTGTAGCCGGTCCCAAGGGTATGGCTGTTTCGCCATTTAAAGTGGTACGTGAGCTGGGTTT	2658
	CTCATC	
2627	ACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCCTATCTGCCGTGGGCGTA?GAA??TTGA-?GAGA??TG?CCCTAGTACGAGAGGACCG	2705
2592	ACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCCTATCTGCCGTGGGCG?TGGA??A?TGA-??GGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCG	2670
2687	ACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGC?GTGGGCG?AGGA??CTTGA?G?GG??CTG?CC?TAGTACGAGAGGACCG	2766
2584	ACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGCCGTGGGCGTTGGAA??TTGAC?GGG??CTGCTCCTAGTACGAGAGGACCG	2663
2512	ACGTCGTGAGACAGTTCGGTCCCTATCTGCCGTGGGTGT?GGAA??TTGA-GAGGA??TGCC??TAGTACGAGAGGACCG	2590
2659	ACGTCGTGAGACAGTTTGGTCCCTATCTGCCGTGGGCGTTGGAAGTTTGA-AGGGGGCTGCTCCTAGTACGAGAGGACCG	2737
2706	GG?TG?ACA??C?ACTGGTGTA?C?GTTGTTCTGCCAAGAGCATCGC?G?GTAGCTA?G??TGGA??GATAA?CGCTGA	2785
2671	GAGTGGACG?A?C?CTGGTGTT?CGTTGT?A?GCCA?TGGA?TGCC?GGTAGCTAA?T?CGGAA??GATAA?GCTGA	2750
2767	GG?TGGA?A?ACC?CTGGTG?CC?GTT?T??GCCA??G?ATCGC?GGGTAGCCA?GT?T?GA??GGATAACCGCTGA	2846
2664	GAGTGGACG?ACC?CTGGTGACC?GTTGT??CGCCAG??CAT?GC?GGGTAGCTA?GT?CGGAAGAGATAACCGCTGA	2743
2591	?GGTG?ACGTACC?CTGGTGACC?GTTGT?CG?GCCA?CGGCA??GC?GGGTAGCTA?GTACGGA?GGGATAACCGCTGA	2670
2738	GAGTGGACGAACCTCTGGTGATCGGTTGTACGCCAGTGGCATTGCCGAGTAGCTAAGTTCGGAAGAGATAACCGCTGA	2817
	GATAAGTGCTGA	
	23S2758r	
2786	AAGCATCTAAGC??GAA?C??ACTC?AAGAT?AA??TTC?C??AA-----G?TC?C??AA--G-----ACTA??	2848
2751	AAGCATCTAAGC?GAA?C??GCC??GAGATGAGT??TCCCTGA??T?T?A??TCCCT?AAGG??GTT??AGAC?A??	2830
2847	AAGCATCTAAGCGGGAA?CC?ACC?CAAGA?AGG??TCCC??T-----????????GAAG??CCGTCG?AGAC?ACG	2920
2744	AAGCATCTAAGCGGGAAACTCGCCTGAAGAT?AG??TCCC?G?G?CTT?A?C?C?CT?AAGGGTCGTTTCGAGACCAGG	2823
2671	A?GCATCTAAGC?GGAAACC??CCTCAAAC?AG??TTC??T?T-----AGA?CCGTGGA-----AGAC?ACC	2734
2818	AAGCATCTAAGCGGGAAACTCGCCTTGAGATGAGACTTCCCGGGA-ACTAGATTCCCTTAAAGGGTCGTTTCGAGACCAGG	2896
	AAGCATCT	
2849	?G?TTGATAGG?T?G?TGTGT?A????G?AA????TTTAGCTGAC?A?TACTAATAGA?CGTT?????????----	2924
2831	ACGTTGATAGG??GGGTGTGTAAGCG??G?GA?GCGTGTAGCTAACC??TACTAAT??CCGTGAGGCTTAACC?T----	2906
2921	ACGTT?ATAGGCCGGGTGTG?AAGCGCGG??ACGCGT??AGCTAACCAGGTACTAAT?G??CGT?CGGCTT??T??C?	3000
2824	ACGTTGATAGG??GGGTGTG?AAG?GC?G?AA?G?T??AGCT?A????TACTAAT?GC????GCTT?A????--	2900
2735	ACGTTGATAGG?C?G?TGTGGAAG??C?G?AA?G?TG?AGCT?AC?G?TACTAAT?G?TCGAT?G??T??T??--	2810
2897	ACGTTGATAGGTCAGGTGTGGAAGCGCAGTAATGCGTTAAGCTAAGTACTAATGCGCGTGGCGCTTGTCTCT----	2972
2924	----- 2924	
2906	----- 2906	
3001	????? 3005	
2900	----- 2900	
2810	----- 2810	
2972	----- 2972	